

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 329**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05765940 .1**
96 Fecha de presentación: **08.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1776465**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54 Título: **MEDIO DE PRUEBA Y PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO O CUALITATIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MATERIALES BIOLÓGICOS EN UNA MUESTRA DE PRUEBA.**

30 Prioridad:
14.06.2004 US 867393

45 Fecha de publicación de la mención BOPÍ:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**MICROLOGY LABORATORIES L.L.C.
19676 RIVERVIEW DRIVE
GOSHEN, IN 46526, US**

72 Inventor/es:
**ROTH, Geoffrey, N. y
ROTH, Jonathan, N.**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 375 329 T3

DESCRIPCIÓN

Medio de prueba y procedimiento cuantitativo o cualitativo para la identificación y diferenciación de materiales biológicos en una muestra de prueba

Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un medio de prueba y un procedimiento para la detección, cuantificación, identificación y/o diferenciación de materiales biológicos en una muestra que puede contener una pluralidad de diferentes materiales biológicos.

Las bacterias son el factor causante de muchas enfermedades de los seres humanos, animales superiores y plantas, y se transmiten comúnmente por vehículos tales como agua, bebidas, alimentos y otros organismos. Las pruebas de estos vehículos potenciales de bacterias son de importancia fundamental y generalmente se basan en "organismos indicadores". Borrego et al., Microbiol. Sem. 13:413-426, (1998). Por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) es un miembro gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae* que es parte de la flora intestinal normal de animales de sangre caliente, y su presencia indica contaminación fecal (por ejemplo, aguas residuales). Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son la verdadera causa de la enfermedad, su presencia es una fuerte indicación de la posible presencia de patógenos asociados con la enfermedad intestinal, tales como cólera, disentería y hepatitis, entre otras. En consecuencia, *E. coli* se ha convertido en el organismo indicador principal de contaminación fecal, y como resultado, cualquier procedimiento que diferencie e identifique *E. coli* a partir de otras bacterias es muy útil.

Otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, denominados comúnmente "coliformes generales," especialmente los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, también se considera que son organismos indicadores significativos para la calidad de agua, bebidas y alimentos. Por lo tanto, las pruebas para identificar y diferenciar coliformes generales a partir de *E. coli* también son muy útiles. Además, se ha demostrado que diversas especies del género *Aeromonas* no sólo son patógenos potenciales, sino que tienen una correlación con otros organismos indicadores (Pettibone et al., J. Appl. Microbiol. 85:723-730 (1998)). Los procedimientos de prueba actuales para identificar, separar y enumerar *Aeromonas spp.* de las *Enterobacteriaceae* muy similares han sido insuficientes y la mayoría de los procedimientos actuales que utilizan sustratos de enzimas no separan *Aeromonas spp.* de *Enterobacteriaceae* debido a sus perfiles bioquímicos casi idénticos. Cualquier procedimiento que depende de la identificación de coliformes generales por medio de un sustrato de β -galactosidasa no diferencia *Aeromonas spp.* de coliformes generales ni elimina *Aeromonas* de la muestra por el uso de inhibidores específicos (antibióticos tales como cefsulodina). Brenner et al., Appl. Envir. Microbio. 59:3534-44 (1993). Éstos no diferencian, identifican ni enumeran *Aeromonas* junto con *E. coli* y coliformes generales. Landre et al., Letters Appl. Microbiol. 26:352-354(1998). Se necesitan procedimientos de prueba mejorados para identificar, separar y enumerar eficazmente tales tipos bacterianos, y hay una búsqueda continua de aparatos y procedimientos de prueba más rápidos, más precisos, más fáciles de usar y más versátiles en este área.

Se han utilizado numerosos procedimientos de prueba para determinar, identificar y enumerar uno o más organismos indicadores. Algunos de estos procedimientos de prueba sólo indican la presencia o ausencia del microorganismo, mientras otros también intentan cuantificar uno o más de los organismos particulares en la muestra de prueba. Por ejemplo, se puede utilizar una prueba cualitativa denominada prueba de Presencia/Ausencia (o P/A), para determinar la presencia o ausencia de coliformes y *E. coli* en una muestra de prueba. Un medio de prueba que incluye el sustrato β -galactosidasa O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), y se inocula el sustrato β -glucuronidasa 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronido (MUG), con la muestra de prueba. Para diferenciar los coliformes generales de *E. coli*, esta prueba se basa en el hecho de que generalmente todos los coliformes producen β -galactosidasa, mientras que sólo *E. coli* produce también β -glucuronidasa además de β -galactosidasa. Si está presente cualquier coliforme (incluyendo *E. coli*), el medio de caldo se vuelve de color amarillo debido a la actividad de la enzima galactosidasa sobre el material de ONPG, provocando la liberación de un pigmento amarillo difusible. Si está presente *E. coli*, el medio de caldo demostrará una fluorescencia azul cuando se irradia con rayos ultravioleta, debido a la degradación del reactivo MUG con la liberación del colorante fluorogénico provocada por la producción de la enzima glucuronidasa. Estas reacciones son muy específicas, y permiten la presencia de ambos coliformes en general, así como que se identifique *E. coli* en una única muestra. Una desventaja de esta prueba es que no es directamente cuantitativa para cualquier tipo bacteriano, ya que ambos reactivos producen pigmentos reactivos. Una segunda desventaja es que se puede producir una reacción positiva falsa de coliformes si están presentes *Aeromonas spp.* en la muestra de prueba. Se ha demostrado que esto es posible incluso cuando hay inhibidores presentes para prevenir supuestamente que esto se produzca (Landre et al., Letters Appl. Microbiol. 26:352-354 (1998)). La prueba también requiere un equipo específico para la producción de los rayos ultravioleta. Además, esta prueba sólo se puede usar para detectar coliformes y *E. coli*. Otros microorganismos importantes, tales como la cepa *E. coli* 0157 que es glucuronidasa negativa, no se detectan, ni son otros microorganismos que no producen galactosidasa-glucuronidasa.

Se ha usado el procedimiento de agar bilis y rojo violeta (VRBA) para determinar la cantidad tanto de coliforme como de *E. coli* en una muestra de prueba. El medio de prueba usado en este procedimiento incluye sales de bilis (para inhibir no-coliformes), lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Puesto que los coliformes (incluyendo *E. coli*) crecen en el medio, la lactosa se fermenta con la producción de ácido, y el rojo neutro en la zona de la colonia bacteriana se vuelve de color rojo ladrillo. Los resultados de esta prueba no siempre son fáciles de interpretar, y para determinar la presencia

de *E. coli*, que confirme las pruebas de seguimiento, tales como fermentación con caldo lactosado verde brillante, se debe realizar el crecimiento en caldo EC a 44,5°C y la siembra sobre agar eosina y azul de metileno (EMBA).

El procedimiento del filtro de membrana (MF) utiliza filtros de microporos a través de los que se hacen pasar las muestras de modo que las bacterias quedan retenidas sobre la superficie del filtro. Este procedimiento se usa más a menudo cuando las poblaciones bacterianas son muy pequeñas, y se necesita una muestra grande para obtener valores adecuados. Después, se coloca el filtro sobre la superficie de un medio elegido, se incuba, y las colonias bacterianas que crecen sobre el filtro de membrana se recuentan y se evalúan. Este procedimiento se usa ampliamente y proporciona buenos resultados cuando se combina con los reactivos y el medio adecuados. Una desventaja de este procedimiento es que es caro y consume mucho tiempo. Tampoco funciona bien con muestras sólidas, o muestras con recuentos particulados elevados. Se puede usar el procedimiento MF junto con el procedimiento inventivo descrito en esta solicitud.

El procedimiento m-Endo también se usa para determinar la cantidad de *E. coli* y coliformes generales y es un procedimiento oficial aprobado por USEPA para someter a prueba la calidad del agua. El medio se usa comúnmente con un filtro de membrana y unidades de formación de colonias (CFU) de *E. coli* y coliformes generales crecen como colonias oscuras con un brillo metálico verde dorado. Debido a una tasa alta probada de errores falsos positivos, se deben confirmar las colonias típicas por la realización de pruebas adicionales. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, 20ª Edición, 9-10 y 9-60 (1998).

Otras pruebas, tales como el número más probable (MPN), utilizan caldos que contienen lactosa (LST, BGLB, EC) para estimar las cantidades de coliformes generales y *E. coli*, pero también se ha demostrado que tienen tasas altas o error, así como que son complicadas y lentas para la producción de resultados. Evans et al., Appl. Envir. Microbiol. 41:130-138 (1981).

El reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) es un compuesto de prueba conocido para identificar coliformes. Cuando actúa por la enzima β-galactosidasa producida por coliformes, X-gal forma un precipitado azul índigo insoluble. X-gal se puede incorporar en un medio de nutriente tal como una placa de agar, y si está presente una muestra que contiene coliformes, los coliformes crecerán como colonias azul índigo. X-gal tiene la ventaja sobre el compuesto ONPG, descrito anteriormente, de que forma un precipitado insoluble en agua más que un compuesto difusible, permitiendo de este modo que se realice una determinación cuantitativa de coliformes cuando la muestra de prueba se incorpora en o sobre un medio solidificado, o cuando las colonias coliformes crecen sobre la superficie de un filtro de membrana que se apoya sobre una almohadilla saturada con un medio líquido o sobre un filtro de membrana que se apoya sobre un medio sólido. Además, no requiere el uso de luz ultravioleta. Un compuesto similar, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-gluc) es un compuesto de prueba conocido para identificar *E. coli*. Cuando actúa por la enzima β-glucuronidasa producida por la mayoría de *E. coli*, X-gluc forma un precipitado azul índigo insoluble. X-gluc tiene la ventaja sobre el compuesto MUG, descrito anteriormente, de que forma un precipitado insoluble en agua, más que un compuesto difusible, permitiendo de este modo que se realice una determinación cuantitativa de *E. coli* cuando la muestra de prueba se incorpora en o sobre un medio solidificado. X-gluc y su capacidad para identificar *E. coli* se describen en Watkins, et al., Appl. Envir. Microbiol. 54:1874-1875 (1988). Un compuesto similar, indoxil-β-D-glucurónido, que también produce colonias de color azul fuerte de *E. coli*, se describió en Ley, et al., Puede. J. Microbiol. 34:690-693 (1987). Aunque X-gal y X-gluc son cada uno útiles de forma separada en la determinación cuantitativa de coliformes (X-gal) o bien de *E. coli* (X-gluc), estos compuestos indicadores tienen la desventaja de que cada uno de ellos contiene el mismo componente cromogénico. Por lo tanto, no se pueden usar juntos para identificar y distinguir tanto *E. coli* como coliformes generales en una única prueba con una única muestra, ya que ambos generan colonias azul índigo de idéntica tonalidad. Una persona que usa ambos reactivos juntos podría identificar cuantitativamente el número total de coliformes, lo mismo que si se usara X-gal solo, pero no podría indicar cuáles de las colonias eran de *E. coli* y cuáles eran otros coliformes aparte de *E. coli*. Un medio de prueba y un procedimiento de prueba exitoso altamente comercializado y recientemente desarrollado para identificar y diferenciar cuantitativamente coliformes generales y *E. coli* en una muestra de prueba se describe en las patentes de los Estados Unidos N° 5.210.022 y 5.393.662, de las que ambas comparten el inventor común con la presente solicitud y que se incorporan en el presente documento por referencia. Este procedimiento y medio de prueba mejora sobre procedimientos de la técnica anterior permitiendo la identificación cuantitativa de coliformes generales y de *E. coli* en una única muestra. No son necesarias pruebas de confirmación adicionales. La muestra de prueba se añade a un medio que contiene un sustrato de β-galactosidasa, tal como 6-cloroindolil-β-D-galactosida, y un sustrato de β-glucuronidasa, tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-gluc). El sustrato de β-galactosidasa puede formar un precipitado insoluble en agua de un primer color tras la reacción con β-galactosidasa, y el sustrato de β-glucuronidasa puede formar un precipitado insoluble en agua de un segundo color, que contrasta con el primer color, tras reaccionar con β-glucuronidasa. Como resultado, las coliformes generales se pueden cuantificar enumerando las colonias del primer color (que tienen actividad β-galactosidasa), y *E. coli* se puede cuantificar enumerando las colonias del segundo color (que tiene actividad tanto β-galactosidasa como β-glucuronidasa). Esta tecnología se ha copiado ampliamente.

Otro aparato y procedimiento de prueba desarrollado recientemente proporciona excelentes resultados para la diferenciación e identificación de coliformes generales, *E. coli* y cepas de *E. coli* 0157 y *Enterobacteriaceae* no coliformes. El procedimiento y medio de prueba se describen en la patente de los Estados Unidos N° 5.726.031, que comparte el inventor común con la presente solicitud, y que se incorpora en el presente documento por referencia.

Se ha usado una determinada clase de sustratos, denominados en el presente documento "no cromogénicos" para detectar diversos microorganismos. Un laminocultivo para detectar *E. coli* usando hidroxiquinolona-β-D-glucurónido se da a conocer por Dalet et al., J. Clin. Microbiol, 33(5):1395-8 (1995). De forma similar, una técnica para la detección de *E. coli* en un medio basado en agar usando 8-hidroxiquinolona-β-D-glucurónido se da a conocer por James et al., Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A], 267(3):316-21 (1988). Es deseable mejorar además la distinción de colores generados en el medio de prueba. Es decir, en los medios de prueba de la técnica anterior que detectan y distinguen dos entidades biológicas, puede surgir confusión entre los dos colores que se muestran en el medio.

Además, es deseable poder identificar y diferenciar otros organismos estrechamente relacionados, tales como los miembros de las familias *Aeromonaceae*, *Vibrionaceae* y *Salmonella*. Por ejemplo, el género *Aeromonas* está estrechamente relacionado con coliformes y da un patrón de prueba bioquímica casi idéntico. Además, el género *Vibrio* también es un tipo importante de bacterias que crece bajo las mismas condiciones generales que los coliformes. Se sabe distinguir colonias de *Aeromonas* de coliformes generales sometiendo a prueba todas las colonias en una muestra dada para determinar la presencia de citocromo oxidasa. De forma no deseable, sin embargo, esto requiere otra serie de pruebas. El documento US 2002/090668 da a conocer un medio de prueba para detectar, cuantificar y diferenciar coliformes generales, *E. coli*, *Salmonella* o *Shigella*, y *Aeromonas*, que comprende: (i) 8-hidroxiquinolona-β-D-glucurónido, que puede formar un precipitado negro en presencia de *E. coli*; (ii) un sustrato cromogénico α-D-galactósido que puede producir un producto insoluble de un primer color en presencia de *Salmonella* o *Shigella*; (iii) un sustrato cromogénico β-D-galactósido que puede producir un producto insoluble de un segundo color en presencia de *Aeromonas*; en el que el color en (ii) y el color en (iii) se combinan para producir un cuarto color en presencia de coliformes generales.

Además, es común encontrar *Aeromonas* en agua y alimentos, y se indica comúnmente en muestras de prueba como coliformes generales, lo que da como resultado un error falso positivo para coliformes generales por la mayoría de los procedimientos de prueba actuales. Se puede prevenir que las *Aeromonas* interfieran con los resultados de coliformes añadiendo ciertos antibióticos al medio. Sin embargo, las cantidades de antibiótico añadido deben ser cuidadosamente controladas. Además, los antibióticos que se han usado convencionalmente tienen periodos de vida cortos en el medio de modo que pierden su potencia rápidamente si no es en una condición de congelación. A menudo puede ser deseable poder cultivar, identificar y enumerar *Aeromonas spp.* lo que no se puede realizar si están inhibidas.

Además, en aquellos casos en los que sea deseable inhibir *Aeromonas*, es deseable un procedimiento mejor para hacerlo, uno en el que la vida útil en almacenamiento del medio no se reduzca de forma apreciable por la inclusión de un inhibidor.

Adicionalmente, también es deseable distinguir las cepas de *Salmonella* de *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas*.

La materia objeto de la invención es un medio de prueba tal como se reivindica en la reivindicación 1. Las realizaciones de la invención se reivindican en las reivindicaciones dependientes.

Sumario de la invención

La presente invención supera las desventajas de los procedimientos de la técnica anterior proporcionando un procedimiento de prueba y un medio adecuado para identificar y diferenciar cuantitativa o cualitativamente coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Salmonella spp.* en una muestra de prueba que puede incluir muchas entidades biológicas diferentes.

En una realización, la presente invención introduce el uso de sustratos "no cromogénicos" para potenciar la distinción entre múltiples colores producidos por distintas entidades biológicas presentes en el medio de prueba inventivo. De forma inesperada, se ha descubierto que otros sustratos "cromogénicos" presentes en el medio de prueba inventivo no interfieren con el color sustancialmente negro logrado con el sustrato no cromogénico. Es decir, mientras que una entidad biológica dada sea sensible al sustrato no cromogénico, las agregaciones de la misma presentes en el medio de prueba se mostrarán de un color sustancialmente negro (independiente de si esa entidad biológica es sensible a uno, dos o más sustratos cromogénicos que también estén presentes en el medio). La presente invención aprovecha esta propiedad no explorada hasta la fecha de sustratos no cromogénicos.

En el presente documento también se describe un medio de prueba para detectar, identificar y cualificar o cuantificar las entidades biológicas primera y segunda. El medio de prueba incluye un medio de nutriente que incluye iones de una sal, un sustrato cromogénico y un sustrato no cromogénico. La primera entidad biológica es sensible al sustrato no cromogénico mientras que la segunda entidad biológica es sensible al sustrato cromogénico. En este medio de prueba, las agregaciones de la primera entidad biológica presente en el medio de prueba son sustancialmente negras y las agregaciones de la segunda entidad biológica presente en el medio de prueba son de un segundo color, siendo el segundo color distinguible del sustancialmente negro.

En una forma, el medio de prueba explica que la primera entidad biológica sea sensible al sustrato cromogénico además de al sustrato no cromogénico. En tal caso, las agregaciones de la primera entidad biológica presente en el medio de prueba se mostrarán sin embargo de color sustancialmente negro.

De forma significativa, incluso aunque las agregaciones de la primera entidad biológica sean sensibles a ambos sustratos primero y segundo en esta forma, estas agregaciones aún se mostrarán de color sustancialmente negro en el medio de prueba. Esto es, el sustrato cromogénico no interfiere con el de color sustancialmente negro. Ventajosamente, esta propiedad de los sustratos no cromogénicos permite que se identifiquen y se diferencien varias entidades biológicas diferentes en un único medio, teniendo las agregaciones de cada entidad biológica un color visualmente distinguible.

En otra forma del medio anteriormente descrito, el medio además incluye el antibiótico ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de *Aeromonas*, *spp.* Ventajosamente, se ha encontrado que el ácido nalidíxico, en comparación con cefsulodina, no reduce significativamente la vida útil en almacenamiento del medio de prueba que lo incorpora.

En este sentido, existe un procedimiento de preparación de un medio de prueba para detectar al menos un primer tipo de entidad biológica y e inhibir el crecimiento de un segundo tipo de entidad biológica en el medio. El procedimiento incluye las etapas de combinar sustratos deseados con un medio de base nutriente; añadir un inhibidor al medio; y después esterilizar el medio sometiendo el medio hasta, al menos, 100°C. Debido a que se añade el inhibidor como una etapa inicial, es innecesaria la posterior adición estéril de inhibidor.

Además, existe un medio de prueba para detectar, identificar y cualificar o cuantificar las entidades biológicas segunda y tercera. El medio de prueba incluye un medio de base nutriente que incluye iones de una sal. Los sustratos cromogénicos primero y segundo y un sustrato no cromogénico se proporcionan en el medio de prueba. Las entidades biológicas primera y segunda son sensibles a los sustratos cromogénicos primero y segundo, respectivamente, y la tercera entidad biológica es sensible al sustrato no cromogénico. Las agregaciones de la primera entidad biológica presente en el medio de prueba son de un primer color, las agregaciones de la segunda entidad biológica presente en el medio de prueba son de un segundo color y las agregaciones de la tercera entidad biológica presente en el medio de prueba son sustancialmente negras.

En una forma, el medio de prueba explica que la tercera entidad biológica sea sensible a los sustratos cromogénicos primero y/o segundo además de al sustrato no cromogénico. En tal caso, las agregaciones de la tercera entidad biológica se mostrarán sin embargo de color sustancialmente negro.

Se debe apreciar que el uso de un sustrato no cromogénico junto con uno o más sustratos cromogénicos incrementa de forma sinérgica el número de entidades biológicas que se pueden detectar y distinguir en un único medio e incrementa de forma sinérgica las posibles combinaciones de colores para una serie dada de entidades biológicas que se van a detectar. Dicho de otro modo, incluyendo un componente no cromogénico como uno de los sustratos, se incrementan de forma sinérgica los grados de libertad para seleccionar otros sustratos y los correspondientes colores para un medio de prueba. Esto es debido a que una agregación de la entidad biológica que es sensible al sustrato no cromogénico se mostrará de forma dependiente de color sustancialmente negro. No es necesario tener en cuenta los efectos de colores combinados con los sustratos no cromogénicos. Por ejemplo, en un medio de prueba que incluye tres sustratos cromogénicos y un sustrato no cromogénico, se evitan al menos tres efectos de combinación de colores combinados usando el componente no cromogénico, en comparación con el uso de cuatro componentes cromogénicos.

Además, existe un medio de prueba que puede detectar, cuantificar, y diferenciar coliformes generales y/o *E. coli*, *spp.* bajo luz ambiental. El medio de prueba comprende un medio de base nutriente que incluye una sal. En el medio se proporciona un primer sustrato que puede formar un primer componente insoluble en agua de un primer color en presencia de *E. coli* y los iones de la sal. El primer color es sustancialmente negro. Se proporciona un segundo sustrato que puede formar un segundo componente insoluble en agua de un segundo color en presencia de coliformes generales. El segundo color es visualmente distinguible del primer color. Por tanto, las colonias de *E. coli* presentes en el medio de prueba se indican por el primer color sustancialmente negro y las colonias de coliformes generales se indican por el segundo color.

En la presente invención, el medio de prueba incluye además un tercer sustrato que puede formar un tercer componente insoluble en agua de un tercer color en presencia de *Salmonella*. El tercer color es distinguible de los colores primero y segundo, por lo que el medio de prueba puede cuantificar y/o diferenciar *E. coli*, coliformes generales y *Salmonella*. Además, los sustratos se seleccionan de modo que los coliformes generales presentes en el medio de prueba también reaccionarán con el tercer sustrato para formar un componente insoluble en agua que incluye el tercer color. En consecuencia, las colonias de coliformes generales se indican en el medio de prueba como un cuarto color, siendo el cuarto color una combinación del segundo color y del tercer color. El cuarto color es visualmente distinguible de los colores primero y tercero. Aún más, los sustratos se pueden seleccionar de modo que las *Aeromonas spp.* forman un componente insoluble del segundo color haciéndolas reaccionar con el segundo sustrato, pero no con los sustratos primero y tercero. Por tanto, en el medio de prueba inventivo, las colonias de *E. coli* generalmente serán negras, las colonias de coliformes generales serán del cuarto color, las colonias de *Aeromonas* serán del segundo color y las colonias de *Salmonella* serán del tercer color.

De forma análoga, existe un procedimiento para detectar, cuantificar y diferenciar bajo luz ambiental coliformes generales, *E. coli* y al menos uno de los géneros *Aeromonas* o *Salmonella* en una muestra de prueba. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar un medio de base nutriente que incluye sustratos primero, segundo y tercero. Cada uno de los sustratos puede formar un componente insoluble en agua en presencia de al menos uno de coliformes

generales, *E. coli*, *Aeromonas*, *Salmonella*. Los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *E. coli* producidas en el medio de prueba son de un primer color, las colonias de coliformes generales producidas en el medio de prueba son de un segundo color y las colonias de uno de *Aeromonas* y *Salmonella* producidas en el medio de prueba son de un tercer color. Cada uno de los colores es visualmente distinguible. El medio de prueba se inocula con la muestra de prueba y después se incuba. Después se examina el medio de prueba para determinar la presencia de las primeras colonias que tienen el primer color, las segundas colonias que tienen el segundo color y las terceras colonias que tienen el tercer color. Las primeras colonias son *E. coli*, las segundas colonias son coliformes generales y las terceras colonias son uno de *Aeromonas* o *Salmonella*.

En una forma de las mismas, el procedimiento inventivo incluye además añadir iones de una sal al medio de prueba para reaccionar con uno o más de los sustratos. Al hacer esto, se produce un precipitado que se muestra de color sustancialmente negro en presencia de la enzima específica para ese sustrato. Un compuesto preferido para formar el color sustancialmente negro en presencia de los iones de la sal consiste en un β -D-glucurónido. Estos compuestos liberan una aglucona cuando se hidroliza lo que forma un complejo insoluble sustancialmente negro en presencia de iones.

En el procedimiento inventivo, el procedimiento comprende además examinar el medio de prueba para determinar la presencia de cuartas colonias que tienen un cuarto color, en el que los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *Aeromonas* son del tercer color y las colonias de *Salmonella* son del cuarto color, siendo el cuarto color visualmente distinguible de los colores primero, segundo y tercero. Los sustratos se pueden seleccionar de modo que el primer color sea sustancialmente negro, el segundo color sea sustancialmente azul-violeta, el tercer color sea sustancialmente rojo-rosa y el cuarto color sea sustancialmente verde azulado-verde.

En otra forma del procedimiento inventivo, los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *Aeromonas* así como las colonias de *Plesiomonas* y *Vibrios* se indiquen como el tercer color.

Una realización de la presente invención usa un sustrato no cromogénico junto con uno o más sustratos cromogénicos y por tanto, incrementa de forma sinérgica los grados de libertad de diseño para seleccionar colores para el medio de prueba inventivo. Esto es debido a que los sustratos cromogénicos no interfieren con el precipitado sustancialmente negro formado por el sustrato no cromogénico.

Otra ventaja de la presente invención es que permite la cuantificación, identificación y diferenciación de cuatro (4) cepas bacterianas diferentes simultáneamente en un único medio de prueba usando una única muestra de prueba, bajo luz ambiental. Se evitan pruebas posteriores con su tiempo adicional concomitante invertido y costes adicionales. Por supuesto, el medio de prueba inventivo de la presente invención también se puede usar puramente para fines cualitativos, como una mera prueba de presencia/ausencia (P/A).

Los sustratos se seleccionan de modo que los colores son fáciles de distinguir visualmente unos de otros sin la necesidad de luz UV u otras ayudas visuales, aparte de, quizás, medios de magnificación. Por ejemplo, en una realización, las colonias de *E. coli* se indican claramente por un precipitado que tiene un color sustancialmente negro, las colonias coliformes generales se indican por un color azul-violeta, las colonias de *Aeromonas* se indican por un color rojo-rosa y las colonias de *Salmonella* se indican por un color verde azulado-verde. Debido a que estos colores son visualmente tan distintos, se reduce ampliamente la confusión entre los colores en comparación con los medios de la técnica anterior. En una realización, se usa MUGluc (ácido 4-metilumbeliferil-Beta-D-glucurónico) en lugar de un sustrato no cromogénico. En este medio de prueba, los coliformes generales estarían indicados por un color azul-violeta o grisáceo. Las colonias de *Aeromonas* indicadas por un color rojo-rosa y las colonias de *Salmonella* indicadas por un color verde azulado-verde; sin embargo, las colonias de *E. coli* se verían iguales en luz visible a las coliformes generales, pero también presentarían fluorescencia de color azulado brillante bajo una luz UV de onda larga y esto se podría distinguir de las otras colonias. Aunque, el producto fluorescente podría difundir más rápidamente que los sustratos cromogénicos o no cromogénicos y hacer más difícil la cuantificación de las colonias de *E. coli*, las colonias de *E. coli* se pueden detectar aproximadamente en un tiempo de incubación de 14 horas, y en cualquier caso, bastará con una prueba de presencia/ausencia para el *E. coli*.

Según la invención, se ha observado que se pueden usar tres sustratos cromogénicos si se combinan apropiadamente. Por ejemplo, un β -glucurónido, tal como X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) o yodo-Gluc (ácido 5-yodo-3-indolil- β -D-glucurónico) se puede usar con sustratos α - y β -D-galactósidos cromogénicos. Ejemplos de sustratos α - y β -galactósidos que pueden ser adecuados son 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido. Los sustratos β -D-glucurónidos y α -D-galactósidos forman el mismo color general en presencia de colonias que producen las enzimas respectivas; sin embargo, los colores se pueden distinguir proporcionando los sustratos en cantidades diferentes de modo que el color resultante producido por uno es más oscuro que el producido por el otro. Además, incluso si los sustratos se proporcionaron aproximadamente en las mismas cantidades, las colonias que reaccionan tanto con β -D-glucurónido como con α -D-galactósido, tales como *E. coli* deberían ser más oscuras que las colonias tales como coliformes generales, que sólo reaccionan con α -D-galactósido. Se debe apreciar, que no sería necesario añadir iones de sal si no se usa un sustrato no cromogénico.

En un aspecto adicional de la presente invención, se puede combinar un sustrato de MUGluc o de otro glucurónido fluorescente en un medio de prueba con un sustrato de glucurónido cromogénico o no cromogénico. En este caso, se

puede usar el sustrato MUGluc para detectar *E. coli* bajo luz fluorescente con menos tiempo de incubación del que se requiere para detectar colonias con un glucurónido cromogénico o no cromogénico. Además, el sustrato MUGluc puede servir como una confirmación de la presencia/ausencia de *E. coli*, si por cualquier razón existe alguna duda como de los colores visibles en luz ambiental producidos por las colonias en presencia de los sustratos.

- 5 Otra ventaja del medio de prueba de la presente invención es su flexibilidad y facilidad de uso. La temperatura de incubación no es crítica ya que se puede producir el crecimiento y la diferenciación de los organismos mencionados dentro de un intervalo óptimo. Por lo tanto, se evitan las etapas de reanimación y la inhibición de cepas sensibles a la temperatura no se produce. Además, se puede usar equipo poco costoso.

- 10 En una realización de la presente invención, la distinción de color obtenida en un medio de prueba se puede intensificar para identificar y diferenciar *E. coli* de coliformes generales. En un medio de prueba, las colonias de *E. coli* presentan un color sustancialmente negro, mientras que los coliformes generales presentan un color rojo-rosa, siendo la distinción entre ambas mucho más evidente que en el medio de prueba de la técnica anterior. Por lo tanto, se reduce ampliamente la confusión entre los dos colores.

- 15 Aún otra ventaja de la presente invención es que permite la identificación y diferenciación de *Aeromonas spp.* de los coliformes generales. El medio de prueba de la técnica anterior requiere de forma no deseable el uso de un inhibidor de cefsulodina para prevenir que crezcan *Aeromonas spp.* en él. Sin embargo, el uso de cefsulodina como inhibidor requiere una etapa adicional en el procedimiento, viz., adición estéril de antibiótico esterilizado de filtrado, y es difícil de controlar. Además, la presencia de cefsulodina reduce significativamente la vida útil en almacenamiento eficaz del medio. Además, el uso de un inhibidor, evidentemente, previene la detección y cuantificación de *Aeromonas spp.*
- 20 Ventajosamente, con la presente invención, se pueden detectar *Aeromonas spp.*, cuantificar y diferenciar de los coliformes generales en un único medio.

- Como una ventaja relacionada, si se desea, no obstante, inhibir el crecimiento de colonias de *Aeromonas spp.* en el medio de prueba, la presente invención proporciona un medio superior para hacerlo. Específicamente, formas preferidas de la presente invención emplean ácido nalidíxico como inhibidor, que ha demostrado tener un efecto mucho menos
- 25 nocivo para la vida útil en almacenamiento del medio al incorporarlo. Además, se puede añadir ácido nalidíxico como parte de la formulación del medio inicial antes de la esterilización, evitando de este modo una etapa del procedimiento costosa y difícil, que se requiere con cefsulodina. Finalmente, el ácido nalidíxico es mucho menos caro que cefsulodina.

- Otra ventaja de la presente invención es que puede proporcionar un medio de prueba para las pruebas cualitativas o
- 30 cuantitativas. Esto es, los medios de prueba de acuerdo con la presente invención se pueden usar como meros dispositivos de prueba de presencia/ausencia, o se pueden usar para cuantificar coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Salmonella spp.*, que son entidades biológicas que se muestran como colonias de diferentes colores sobre el medio de prueba inventivo.

Descripción detallada de la invención

- El procedimiento y el medio de la presente invención permite la detección, cuantificación, identificación y diferenciación
- 35 simultáneas de coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Salmonella spp.* en una muestra de poblaciones mezcladas de entidades biológicas. El procedimiento y el medio inventivos son particularmente útiles para la detección, cuantificación, identificación y diferenciación de *E. coli* y coliformes generales, y para la identificación y diferenciación cuantitativa adicional de otras entidades biológicas seleccionadas, incluyendo especies bacterianas *Aeromonas*, *Salmonella*, y *Vibrio*. Por lo tanto, la materia objeto de esta invención es el medio de prueba reivindicado la
- 40 reivindicación 1.

- El procedimiento y el medio de prueba que incorpora la presente invención utilizan el hecho de que la actividad enzimática de entidades biológicas y específicamente de bacterias varía con el género, y/o la familia de bacterias de interés. El procedimiento y el medio de prueba que incorpora la presente invención utilizan además el hecho de que se
- 45 pueden usar diversas enzimas que identifican complejos de sustrato para identificar enzimas específicas con la producción de colores distintivos. De forma significativa, en una realización de la presente invención, el procedimiento y el medio de prueba que incorpora la presente invención aprovecha el hecho de que los sustratos cromogénicos presentes en un medio de prueba no interfieren con el color sustancialmente negro producido por los sustratos no cromogénicos.

- Se conocen sustratos no cromogénicos en la técnica, *per se*, y el comportamiento de un sustrato no cromogénico en un
- 50 medio que incluye la combinación de sustratos cromogénicos es único. Para su ilustración, las agregaciones de una entidad biológica que son sensibles a dos sustratos cromogénicos se mostrarán normalmente en un medio de prueba como una combinación de los dos colores producidos tras la escisión de los dos respectivos sustratos. Cuando están implicados tres sustratos cromogénicos, como en otra realización de la invención, el efecto de color combinado no es obvio de predecir ni de explicar. Además, las variaciones inherentes en la cantidad de enzimas producidas por cepas
- 55 particulares de entidades biológicas pueden dar como resultado diferentes matices o tonos de colores tras la escisión de los sustratos cromogénicos. En consecuencia, los colores pueden ser difíciles de distinguir para la persona no especializada que examina el medio de prueba. Por lo tanto, los sustratos cromogénicos se deben elegir y usar en una concentración en vista de los otros sustratos cromogénicos que se planea incluir en un medio de prueba dado.

Este no es el caso con los componentes no cromogénicos. Mientras las agregaciones de entidades biológicas, que son sensibles a sustratos cromogénicos además de a sustratos no cromogénicos, pueden mostrar que en el medio de prueba tienen un "halo" fluorescente o coloreado, tales agregaciones, no obstante, aparecen de color sustancialmente negro y, por lo tanto, son fáciles de identificar. Con los componentes no cromogénicos se logran múltiples "grados de libertad".

El uso de un sustrato no cromogénico es una forma de permitir un único medio de prueba para diferenciar cuatro (4) cepas bacterianas diferentes con cuatro (4) colores visualmente distinguibles. El color negro es difícil de confundir. Además, la pigmentación sustancialmente negra no se difunde de modo que la localización de las colonias se conoce de forma precisa y las colonias se pueden contar con exactitud. Los sustratos no cromogénicos producen un compuesto quelado insoluble que es diferente del dímero que se produce por los sustratos cromogénicos.

El medio de prueba y el procedimiento inventivos no sólo permiten una detección, cuantificación o identificación y diferenciación cualitativa de coliformes generales y de *E. coli*, sino también de *Salmonella* y *Aeromonas*, así como *Plesiomonas* y *Vibrio*. Las especies *Plesiomonas* y *Vibrios* se determinan pero no se diferencian de la especie *Aeromonas* ya que están muy estrechamente relacionadas.

Definiciones

Las entidades biológicas, tales como coliformes generales, *E. coli*, etc., están referidas en el presente documento como "sensibles" a determinados sustratos cromogénicos y no cromogénicos. Más específicamente, una entidad biológica producirá previsiblemente enzimas específicas cuando la entidad esté presente en un medio de prueba tal como el descrito a continuación en el presente documento. Estas enzimas escindirán selectivamente sustratos cromogénicos y no cromogénicos. Tras la escisión, estos sustratos producen un color en el medio de prueba. El mecanismo para producir el color es diferente para sustratos cromogénicos y no cromogénicos, como se describe a continuación en el presente documento.

Los microorganismos que tienen actividad β -galactosidasa incluyen aquellos conocidos comúnmente por la designación "coliforme". Existen varias definiciones de "coliforme", pero generalmente las más aceptadas incluyen bacterias que son los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y tienen la capacidad de fermentar el azúcar lactosa con la evolución de gas y ácido. La mayoría de los coliformes son positivos tanto para α - como para β -galactosidasa. Esto es, producen tanto α - como β -galactosidasas.

Los microorganismos que tienen actividad β -glucuronidasa además de actividad galactosidasa incluyen principalmente la mayoría de las cepas de *Escherichia coli*. Esto es, *E. coli* es positivo tanto para α - como para β -galactosidasa así como para β -glucuronidasa.

El término "coliformes generales" como se usa en esta solicitud se refiere a coliformes aparte de las distintas cepas de *E. coli*. Estos "coliformes generales" son gram-negativos, microorganismos que no forman esporas que tienen generalmente actividad α - y β -galactosidasa (es decir, fermentadores de lactosa), pero que no tienen actividad β -glucuronidasa, y que tienen la capacidad de fermentar el azúcar sorbitol.

Para los propósitos de esta especificación, un "sustrato cromogénico" es un sustrato que no necesita productos químicos adicionales presentes en el medio de prueba tras la hidrólisis para la producción de color. Esto es, un sustrato cromogénico se escinde por la enzima específica correspondiente a ese sustrato para formar un dímero concentrándose el color en la zona de escisión del sustrato. Se conocen muchos sustratos cromogénicos en la técnica. Para los propósitos de esta especificación, "cromogénico" incluye sustratos fluorogénicos. Los productos de sustratos fluorogénicos requieren luz ultravioleta (UV) para ser detectados y son más solubles en agua que otros sustratos cromogénicos.

Ciertos sustratos, denominados en el presente documento "no cromogénicos", producen un precipitado oscuro, sustancialmente negro en presencia de iones de una sal y de actividad enzimática. Por ejemplo, 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucuronido, cuando se incluye en un medio junto con una sal que produce iones, tal como citrato de amonio férrico, producirá un precipitado sustancialmente negro en presencia de β -glucuronidasa producida por *E. coli* u otras entidades biológicas. Más específicamente, tras la escisión del sustrato no cromogénico por la enzima particular, se forma en el medio un complejo insoluble en agua sustancialmente negro. El precipitado sustancialmente negro consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*. Este precipitado es un compuesto quelado que no se difunde. Ni es el color sustancialmente negro susceptible de interferencia de los compuestos cromogénicos presentes en el medio de prueba.

Para los propósitos de esta especificación, un "sustrato no cromogénico" significa que debe estar presente un producto químico además de los usados con componentes cromogénicos en el medio de prueba cuando el sustrato se escinde por su correspondiente enzima. El precipitado sustancialmente negro formado de este modo es una combinación del complejo sustrato - sal y no es un dímero ya que está formado por los "compuestos cromogénicos."

Para los propósitos de esta especificación, la expresión "bajo luz ambiental" se refiere al espectro visible, es decir, colores que se pueden observar y distinguir a simple vista. Una colonia presente en un medio de prueba que requiere luz ultravioleta para ser observada, por ejemplo, no podrían entrar bajo la definición de "bajo luz ambiental". Sin

embargo, debe entenderse que el término "bajo luz ambiental" incluye el uso de un dispositivo de magnificación, si fuera necesario. La magnificación puede ser especialmente útil cuando se cuentan numerosas colonias. El término "visualmente distinguible" se refiere a dos o más colores que se pueden diferenciar bajo luz ambiental.

Para los propósitos de esta especificación, el término "sustancialmente negro" incluye de marrón oscuro a negro, e incluye también negro con distintos halos coloreados, tales como rojo-violeta, verde, fluorescente, etc.

Para otros propósitos de esta especificación, los nombres de los colores citados en el presente documento se dan como guía, pero debe entenderse que los nombres de los colores de deben leer en sentido amplio. Esto es, puede haber superposición entre los colores citados. Esto es debido a que, como se ha debatido, las entidades biológicas producen cantidades variables de enzimas, lo que a su vez afecta al matiz o tono del color resultante.

- 10 El término "sustrato de β -galactosidasa" como se utiliza en el presente documento se refiere a β -galactósido que comprende galactosa unida mediante unión β a un sustituyente que forma un compuesto detectable cuando se libera por la acción de β -galactosidasa sobre el sustrato. De forma similar, el término "sustrato de α -galactosidasa" como se usa en el presente documento se refiere a α -galactósido que comprende galactosa unida por unión α a un sustituyente que forma un compuesto detectable cuando se libera por la acción de α -galactosidasa sobre el sustrato. El término
- 15 "sustrato de β -glucuronidasa" como se utiliza en el presente documento se refiere a β -glucurónido que comprende ácido glucurónico unido mediante unión β a un sustituyente que forma un precipitado detectable cuando se libera por la acción de β -glucuronidasa sobre el sustrato.

- Los sustratos α - y β -galactosidasa y compuestos y cualquier otro sustrato descritos en el presente documento así como los sustratos β -glucuronidasa y compuestos y cualquier otro sustrato descrito en el presente documento pueden comprender sales de carboxilato formadas haciendo reaccionar una base adecuada con el grupo carboxilo glucurónico o galactósido apropiado. Bases adecuadas incluyen carbonatos o hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, y los correspondientes carbonatos; y bases de nitrógeno tales como amoníaco, y alquilaminas tales como trimetilamina, trietilamina y ciclohexilamina.

25 **Designación de un medio de prueba para entidades biológicas específicas**

- Se pueden distinguir ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* por la presencia de actividad α -galactosidasa en ausencia de actividad β -galactosidasa, o *vice-versa*. Por ejemplo, la mayoría de *Salmonella* y *Shigella spp.* son positivos para α -galactosidasa, pero son negativos para β -galactosidasa. De forma similar, se pueden distinguir *Aeromonas spp.* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* por la presencia de actividad β -galactosidasa en ausencia de actividad α -galactosidasa. El procedimiento y el medio que incorpora la presente invención están diseñados para aprovechar estas características distintivas. Por ejemplo, la especificidad de la actividad enzimática para *Salmonella* y *Aeromonas spp.*, en lugar de coliformes generales, se puede aprovechar, como se ilustra a continuación.

- El procedimiento descrito en el presente documento es particularmente adecuado para la detección, cuantificación o identificación y diferenciación cualitativas de las diferentes clases de microorganismos descritos anteriormente, viz., coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*. Aunque el procedimiento inventivo es particularmente adecuado para estos microorganismos particulares, no se limita a ellos. En su lugar, las técnicas descritas en el presente documento tienen aplicación para la identificación y diferenciación de una amplia variedad de entidades biológicas.

- Esto es, las entidades biológicas específicas son "sensibles" a distintos sustratos. Más en particular, estas entidades biológicas producen o contienen de forma previsible enzimas conocidas. Los sustratos, cromogénicos o bien no cromogénicos, se pueden seleccionar los que, en presencia de una enzima(s) particular(es), formarán un producto de un color previsible y distinguible. Se pueden seleccionar múltiples sustratos para identificar simultáneamente una pluralidad de entidades biológicas distintas en un único medio de prueba, siendo identificables las agregaciones de cada entidad distinta por un color distinguible, separado. Además, mientras que ciertas realizaciones dadas a conocer en el presente documento distinguen todas las distintas agregaciones presentes en un medio de prueba bajo luz ambiental, ya que ese término se define en el presente documento, esto no es necesario. Por ejemplo, varios sustratos dados a conocer en el presente documento requieren el uso de luz ultravioleta para que se puedan observar las agregaciones presentes en el medio.

La tabla I enumera diversas enzimas cuya presencia se puede detectar usando varios de los sustratos enumerados en la tabla II.

TABLA I

Enzimas y abreviaturas	
Aara= α -D-arabinopiranosidasa	Bglu= β -D-glucopiranosidasa
Agal= α -D-galactopiranosidasa	Bgluc= β -D-glucuronidasa
Aglu= α -D-glucopiranosidasa	Bman= β -D-manopiranosidasa

Enzimas y abreviaturas	
Bcel= β -D-celopiranosidasa	Bxyl= β -D-xilopiranosidasa
Bfuc= β -D-fucopiranosidasa	Nagal=N-acetil- β -D-galactopiranosidasa
Bgal= β -D-galactopiranosidasa	Naglu=N-acetil- β -D-glucopiranosidasa
Afuc= α -D-fucopiranosidasa (continuación)	binopiranosidasa
Bxyl= β -D-xilopiranosidasa	Acel= α -D-celopiranosidasa
Aman= α -D-manopiranosidasa	Agluc= α -D-glucuronidasa
Axyl= α -D-xilopiranosidasa	Naglu=N-acetil- β -D-glucuronidasa
esterasa	

Tabla II

Distintos sustratos y color tras la escisión	
sustratos de 6-cloro-3-indolilo	Rosa
sustratos de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo	Verde azulado
sustratos de 3-indolilo	Verde azulado
sustratos de N-metilindolilo	Verde
sustratos de nitrofenilo	Amarillo
sustratos de nitroanilina	Amarillo
sustratos de 8-hidroxiquinolina (e iones de sal)	Sustancialmente negro
sustratos de ciclohexenoesculetina (e iones de sal)	Sustancialmente negro
sustratos de esculetina (e iones de sal)	Sustancialmente negro
sustratos de quinolina (e iones de sal)	Sustancialmente negro
sustratos de 5-yodo-3-indolilo	Púrpura
sustratos de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo	Magenta
sustratos de 6-fluoro-3-indolilo	Rosa
sustratos de cumarina	Fluorescente
sustratos de fluoresceína	Fluorescente
sustratos de rodamina	Fluorescente
sustratos de resorufina	Fluorescente

Los compuestos de sustratos específicos aplicables para usar con el medio de prueba de la presente invención están disponibles como sigue:

- 5 bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) es un sustrato de β -galactosidasa comercialmente disponible que produce un precipitado insoluble que tiene un color aproximadamente verde azulado cuando se hizo reaccionar por β -galactosidasa y está disponible de Biosynth International, Naperville, IL.
- cloro-3-indolil- β -D-glucurónido es un compuesto que produce un precipitado insoluble que tiene un color magenta, cuya preparación se describe en la patente de los Estados Unidos N° 5.210.022 mencionada anteriormente e incorporada por referencia y está disponible de Research Organics, Cleveland, OH.
- 10 El compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-gluc) es un β -glucurónido comercialmente disponible que produce un precipitado insoluble que tiene un color aproximadamente verde azulado cuando se hizo reaccionar por β -glucuronidasa. De forma similar, indoxil- β -glucurónido es un compuesto similar, cuya preparación se describe en el artículo mencionado anteriormente por Ley et al., en Can J. Microbiol., cuya divulgación se incorpora por referencia.
- 15 Otro β -galactósido adecuado es el compuesto 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido que produce un precipitado insoluble que tiene un color rosa/magenta, cuya preparación se describe en la patente de los Estados Unidos N°. 5.210.022 mencionada anteriormente.

Otros compuestos adecuados aplicables como sustratos en la práctica de la presente invención se especifican en la patente de los Estados Unidos N°. 5.210.022, todos ellos se incorporan en el presente documento por referencia.

El sustrato 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido es un β-glucurónido comercialmente disponible que, en presencia de iones metálicos tales como hierro, produce un precipitado insoluble que tiene un color sustancialmente negro cuando se hizo reaccionar por β-glucuronidasa y en presencia de otros sustratos de α- o β-galactósido. 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido está disponible de Biosynth International, Naperville, IL.

Además, una sal que proporciona iones adecuados para su uso con la presente invención es citrato de amonio férrico, disponible de Sigma Chemical, St. Louis, MO. Los sustratos de ciclohexenoesculetina se describen en James et al., Appl. & Envir. Micro. 62:3868-3870 (1996) y en presencia de iones férricos, producen un precipitado sustancialmente negro insoluble.

Los sustratos de N-metil-indolilo tales como N-metilhidroxi-β-D-galactopiranósido están comercialmente disponibles de Biosynth International, Naperville, IL.

Los sustratos de nitrofenilo, tales como 2-nitrofenil-β-D-galactopiranósido, están comercialmente disponibles de Biosynth International, Naperville, IL. De forma similar, los compuestos de nitroanilina están disponibles para la síntesis a través de Sigma Chemical, St. Louis, MO.

Otros sustratos que producen un color sustancialmente negro incluyen sustratos de esculetina tales como ciclohexenoesculetina-β-D-galactósido, que se describe en James et al., Appl. & Envir. Microbiol. 62:3868-3870 (1996). Los sustratos de quinolina, tales como 8-hidroxiquinolina-β-D-galactopiranósido y 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido están disponibles a través de Biosynth International, Naperville, IL.

Los sustratos de yodo-indolilo, tales como 5-yodo-3-indolil-β-D-galactopiranósido están disponibles a través de Biosynth International, Naperville, IL.

Varios sustratos fluorescentes son adecuados para su uso con la presente invención. Los sustratos de cumarina tales como los sustratos de 4-metilumbeliferilo y los sustratos de 5-trifluorometilumbeliferilo están comercialmente disponibles de Biosynth International, Naperville, IL. También son adecuados los sustratos de fluoresceína, los sustratos de rodamina y los sustratos de resorufina. No se conoce ninguna fuente comercial para estos tres sustratos pero los componentes están disponibles de Sigma Chemical, St. Louis, MO.

Aunque se han enumerado ejemplos específicos de sustratos adecuados para su uso con la presente invención anteriormente en el presente documento, no se debe interpretar que éstos limiten la invención de ninguna forma. En su lugar, un experto en la técnica puede usar las tablas IV y V a continuación en el presente documento para identificar un número virtualmente ilimitado de sustratos.

Preparación del medio de prueba

El medio de prueba se forma combinando los sustratos deseados con un medio de base nutriente. El medio de base nutriente puede ser cualquier medio de cultivo conocido en la técnica para proporcionar el mantenimiento y la reproducción de células vivas. Generalmente, estos medios incluyen nutrientes, tampones, agua y, a veces, un agente gelificante. Posibles agentes gelificantes incluyen ágaes, pectinas, carragenanos, alginatos, algarroba y xantinas, entre otros.

El siguiente es un ejemplo de la preparación de un medio de prueba adecuado para su uso en esta invención. Este ejemplo coincide con el ejemplo I, a continuación.

Se añaden los sustratos 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranósido, y 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido en cantidades de medio de 250 mg/l; medio de 70 mg/l; y medio de 175 mg/l, respectivamente. Se añaden los sustratos directamente al medio (fórmula a continuación) caliente (75° - 85°C) a un mezclador antes de proceder a la esterilización.

Se puede preparar el medio de agar estándar añadiendo 15 gm de goma agar de calidad bacteriológica a la siguiente fórmula nutriente

45	Digerido pancreático de caseína	5,0 gm
	Extracto de levadura	3,0 gm
	Fosfato de dipotasio	0,3 gm
	Agua desionizada	990 ml
50	Citrato de amonio férrico (esterilizado de forma separada a partir de los otros componentes)	800 mg en 10 ml de agua desionizada

y después esterilizando a 121°C durante 15 minutos. Debe ajustarse el medio para dar como resultado un pH de 7,0. Se deja gotear el medio agar esterilizado hasta una temperatura de 45°C en un baño de agua y después se añade la solución estéril que contiene los sustratos preparados como se describe anteriormente. Se mezcla el medio enérgicamente y se vierte en placas de petri estériles a un volumen de 20 ml/placa.

- 5 Se puede preparar un medio de prueba basado en pectina usando las mismas etapas descritas anteriormente, excepto porque se usan 25 gm de pectina de bajo metoxilo como agente solidificante y se vierte el medio a temperatura ambiente en placas de petri que contenían una fina capa de gel que contenía iones de calcio que, combinados con la pectina forman un gel sólido. Se describe un medio de cultivo de pectina adecuado en la patente de los Estados Unidos N°. 4. 241.186 y en la patente de los Estados Unidos N°. 4.282.317, de las que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Se prefiere un medio basado en pectina sobre un medio de agar estándar debido a que tiene las ventajas de conveniencia e independencia de la temperatura para el usuario. El uso de medio de pectina está bien descrito y aceptado como resultado de estudios colaborativos de AOAC y otras investigaciones publicadas e internas.

- 15 Un medio de pectina adecuado está comercialmente disponible de Micrology Laboratories, LLC bajo la marca comercial Easygel®. El medio de base acuosa sin agente gelificante está disponible se Micrology Labs, Goshen IN., para su uso con filtros de membrana.

Inoculación del medio de prueba con la muestra

- 20 Se puede inocular el medio de prueba con una muestra que se va a someter a prueba para determinar la presencia de microorganismos por cualquier procedimiento conocido en la técnica para inocular un medio con una muestra que contiene microorganismos. Por ejemplo, se puede añadir la muestra que se va a someter a prueba a las placas de petri antes de añadir el medio de base nutriente (técnica de vertido en placa) o extender sobre la superficie de las placas después de que se haya enfriado y solidificado (técnica de lavado o de rayado de placa). También se pueden filtrar muestras líquidas a través de un filtro de membrana microporoso (0,45 micrómetros de tamaño) que después se coloca sobre la superficie de un medio sólido o sobre una almohadilla saturada con el medio.

Incubación del medio de prueba

- 25 Se incuba el medio de prueba inoculado durante un tiempo suficiente y a una temperatura tal para que los microorganismos individuales presentes en la muestra crezcan en colonias detectables. Las condiciones de incubación adecuadas para el crecimiento de microorganismos en un medio son conocidas en la técnica. Comúnmente, se incuba el medio de prueba durante aproximadamente 24-48 horas a una temperatura de aproximadamente 30°-40°C. Se puede requerir menos tiempo de incubación, tal como aproximadamente 14 horas, hasta obtener resultados para un sustrato fluorescente.

- 35 A menos que se usen inhibidores de la población microbiana general, la población microbiana general, así como coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.*, y *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* crecerá en el medio de prueba incubado. Debido a que los precipitados formados son insolubles (excepto para los sustratos fluorogénicos) en el medio de prueba, éstos permanecen en la proximidad inmediata de los microorganismos que producen las diversas enzimas. Mientras los microorganismos se reproducen para formar colonias, las colonias se muestran como unidades de formación de colonias que tienen el color producido por el sustrato particular.

- 40 Por ejemplo, *E. coli* produce β -galactosidasa y α -galactosidasa, pero, a diferencia de coliformes generales y de *Aeromonas spp.*, también produce β -glucuronidasa. Por lo tanto, los precipitados insolubles de cada uno de los sustratos de β -galactosidasa, los sustratos de α -galactosidasa y los sustratos de β -glucuronidos no cromogénicos se forman por la acción de las respectivas enzimas de modo que esas colonias de *E. coli* se muestran de un color sustancialmente negro, que a veces tienen un halo violeta-azul alrededor de las mismas.

- 45 Los coliformes generales producen β -galactosidasa y α -galactosidasa y, en consecuencia, escinden tanto los sustratos de α -galactosidasa como los de β -galactosidasa. En el presente ejemplo, el sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido produce un color azul-verde o verde azulado, mientras que el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido produce un color rosa, o rojo-rosa. Por tanto, las colonias de coliformes generales se mostrarán de un color azul-violeta, que es una combinación de los colores producidos por cada uno de los α - y β -galactósidos, respectivamente.

- 50 De forma significativa, sin embargo, se ha observado que *Aeromonas spp.*, que están estrechamente relacionadas con los coliformes, y que dan un patrón de prueba bioquímica casi idéntico, son β -galactosidasa positivos y α -galactosidasa negativos. Esto es, las *Aeromonas spp.* no hidrolizarán el sustrato de α -galactósido. Por lo tanto, las colonias de *Aeromonas* presentes en el medio de prueba se mostrarán como colonias que tienen el color rosa-rojo producido por el sustrato de β -galactósido.

- 55 Además, se ha observado que los miembros del género *Salmonella* son positivos para α -galactosidasa, pero negativos para β -galactosidasa. Esto es, *Salmonella* no hidrolizará el sustrato de β -galactosidasa. Por lo tanto, las colonias de *Salmonella* presentes en el medio de prueba aparecerán como un color verde azulado o azul-verde producido por el sustrato de α -galactósido.

Examen del medio de prueba y enumeración de microorganismos

Los sustratos seleccionados para el ejemplo anterior producen tres colores distintos, y los coliformes generales se indican por un cuarto color que es una combinación de dos de los tres colores. Esto es, las colonias de *E. coli* se muestran de color sustancialmente negro, las colonias de coliformes generales se muestran de color azul-violeta, las colonias de *Aeromonas* se muestran de color rojo-rosa, y las colonias de *Salmonella* se muestran de color verde azulado-verde. Aunque los matices individuales de estos colores pueden variar algo en el medio de prueba debido a factores tales como la variación en la producción de enzimas de las entidades biológicas, se ha observado que estos cuatro colores son suficientemente distintos, de modo que la confusión entre ellos es improbable.

Las colonias de cada tipo de microorganismo se pueden enumerar contando las colonias o por otros procedimientos conocidos en la técnica para enumerar microorganismos sobre una placa de prueba. El número de colonias de cada tipo generalmente indica el número de microorganismos de cada tipo presentes originalmente en la muestra antes de la incubación.

Componentes opcionales

Inhibidores

El procedimiento de la presente invención no requiere inhibidores. Sin embargo, se puede hacer que el medio sea más selectivo para coliformes generales y *E. coli* si se desea por la adición de distintos compuestos que son inhibidores de la población microbiana general, pero que tienen poco o ningún efecto sobre coliformes. Los siguientes son algunos compuestos que se pueden usar: a) sales de bilis, de aproximadamente 0,3 g/litro, b) lauril sulfato de sodio, aproximadamente 0,2 g/litro, c) desoxicolato de sodio, aproximadamente 0,2 g/litro, d) Tergitol 7, aproximadamente 0,1 ml/litro. El uso de uno o más de estos compuestos reduce la presencia de microorganismos de fondo (no coliformes) y y hace que la placa esté menos llena y elimina la posibilidad de inhibición o de interferencia por organismos no coliformes en la muestra. El uso de ciertos antibióticos puede conseguir el mismo resultado.

Cefsulodina se usa comúnmente en medios de prueba actualmente disponibles para inhibir *Aeromonas spp.* Sin embargo, el uso de cefsulodina como inhibidor requiere una etapa adicional en el procedimiento, viz., adición estéril de antibiótico esterilizado de filtrado. Esta etapa es difícil de controlar. Además, la presencia de cefsulodina reduce significativamente la vida útil en almacenamiento eficaz del medio. Se ha observado que se puede usar ácido nalidíxico en lugar de Cefsulodina para inhibir *Aeromonas spp.* aproximadamente con la misma eficacia. Es preferible el ácido nalidíxico porque puede sobrevivir a la temperatura de aproximadamente 120°C alcanzada en la autoclave del medio de prueba. Por lo tanto, a diferencia de cefsulodina, se puede añadir ácido nalidíxico al medio de prueba como parte de la formulación del medio inicial antes de proceder a esterilización (véase, preparación del medio de prueba, anteriormente). También se deduce que la resistencia del ácido nalidíxico a condiciones ambientales desfavorables dará como resultado una vida útil en almacenamiento mayor para un medio que lo contiene en comparación con cefsulodina.

Inductores

Es posible que se pueda potenciar la producción de enzimas de los coliformes generales por la adición a las formulaciones del medio de cantidades muy pequeñas de sustancias conocidas como inductores enzimáticos. Está disponible un inductor específico para β -galactosidasa y se conoce químicamente como isopropil- β -tiogalactopiranosido. La adición de aproximadamente 100 mg/litro de medio tiene un efecto positivo y notable sobre la velocidad de producción de enzimas para algunas especies de coliformes. Están disponibles otros inductores enzimáticos y se pueden añadir a formulaciones del medio si se considera útil potenciar la producción de enzimas.

EJEMPLOS

A continuación se enumeran ejemplos amplios de combinaciones enzima sustrato en medios de prueba para usarse en combinación con la fórmula nutriente debatida anteriormente u otras fórmulas nutrientes adecuadas que se pueden preparar en la práctica de la presente invención.

La tabla III ilustra la flexibilidad de las realizaciones preferidas que incorpora la presente invención. La tabla III es una matriz de algunas de las posibles combinaciones de cuatro colores disponibles para las entidades biológicas preferidas *E. coli*, coliformes generales, y al menos una del género *Aeromonas* o *Salmonella* para ser detectadas usando las enseñanzas de la divulgación. De acuerdo con la invención, se detectan tanto *Aeromonas* como *Salmonella*.

Son posibles otras combinaciones de colores. En muchos casos, una pluralidad de diferentes sustratos logrará un resultado deseado, siendo la única diferencia los colores detectados para una enzima específica. La elección del color preferido para la detección de *E. coli* se denota con un asterisco en la tabla III, dependiendo de los colores elegidos para detectar otros microorganismos. Como se debatió anteriormente, otros sustratos cromogénicos no interfieren con el color sustancialmente negro, y el color sustancialmente negro es fácil de distinguir de los otros colores.

Como se debatió anteriormente, el uso de la tabla III requiere tener en cuenta el efecto de color combinado debatido anteriormente que se produce por la inclusión de múltiples sustratos cromogénicos en un único medio. Por ejemplo, con referencia a la primera entrada en la tabla III, se puede entender que los coliformes generales aparecerán como una

combinación de (1) rojo-rosa (magenta) y (2) verde azulado, siendo el color resultante azul-violeta. Este es el caso porque el que los coliformes general son sensibles a dos sustratos cromogénicos. De forma similar, los coliformes general se mostrarán en un medio de prueba de acuerdo con la segunda entrada de la tabla III como una combinación de (1) rojo-rosa (magenta) y (2) amarillo.

TABLA III

Posibilidades de color para la detección microorganismos preferidos										
color deseado	rojo-rosa o magenta	verde azulado	verde	amarillo	negro	fluorescente	fluorescente	azul oscuro /púrpura	azul claro/gris	
1	coliformes generales Aeromonas	coliformes generales Salmonella*	E. coli	E. coli	E. coli	E. coli				
2	coliformes generales Aeromonas	E. coli	E. coli	coliformes generales Salmonella*	E. coli	E. coli				
3	E. coli	coliformes generales Aeromonas	E. coli	coliformes generales Salmonella*	E. coli	E. coli				
4	coliformes generales Salmonella*	E. coli	coliformes generales Aeromonas	E. coli	E. coli	E. coli				
5	E. coli	coliformes generales Salmonella*	coliformes generales Aeromonas	E. coli	E. coli	E. coli				
6	E. coli	E. coli	coliformes generales Aeromonas	coliformes generales Salmonella*	E. coli	E. coli				
7	E. coli	E. coli	E. coli	E. coli	coliformes generales Aeromonas	coliformes generales Salmonella*	E. coli			
8	coliformes generales Aeromonas	E. coli	E. coli	E. coli	E. coli	coliformes generales Salmonella*	E. coli			
9	E. coli	coliformes generales Aeromonas	E. coli	E. coli	E. coli	coliformes generales Salmonella*	E. coli			

Posibilidades de color para la detección microorganismos preferidos										
color deseado	rojo-rosa o magenta	verde azulado	verde	amarillo	negro	fluorescente	fluorescente	fluorescente	azul oscuro /púrpura	azul claro/gris
10	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliforme general <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>			
11	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>			
12	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>				
13	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>				
14	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>				
15	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *	<i>E. coli</i>				
16	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	coliformes generales <i>Aeromonas</i>	coliformes generales <i>Salmonella</i> *			
17	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i>				<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i>	coliformes generales
* <i>Shigella</i> también se puede mostrar de este color.										

La tabla IV es una lista parcial de patrones de enzimas para entidades biológicas preferidas para ser detectadas de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación. Se debe entender que un experto en la técnica reconocerá fácilmente que otras enzimas que se conocen y que se han producido, y enzimas que sólo se conocen a nivel teórico, también se podrían llevar a cabo satisfactoriamente.

TABLA IV

NOMBRE DE LA ENZIMA	<i>E. coli</i>	COLIFORME GENERAL	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Vibrio</i>
Aara= α -D-arabinopiranosidasa	+	+	-	+		
Agal= α -D-galactopiranosidasa	+	+	-	+		
Aglu= α -D-glucopiranosidasa	-	+	+	-	+	
Bcel= β -D-celopiranosidasa	-	+	-	-	-	-
Bfuc= β -D-fucopiranosidasa	+	+	+	-	-	-
Bgal= β -D-galactopiranosidasa	+	+	+	-	+	+
Bgal= β -D-glucopiranosidasa	+	+	+	-	-	-
Bgluc= β -D-glucuronidasa	+		-	-	-	-
Bman= β -D-manopiranosidasa	+	+	-	+	+	+
Bxyl= β -D-xilopiranosidasa	-	+	-	-		
Nagal= N-acetil- β -D-galactopiranosidasa	-	+	+	-	+	+
Naglu= N-acetil- β -D-glucopiranosidasa	-	+	+	-	+	+
Aman= α -D-manopiranosidasa	-	-	-	-	-	-
esterasa = esterasa	-	-	-	+	-	

La tabla V es una matriz que muestra una amplia variedad de sustratos y sus colores asociados para su uso probar medios de prueba de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación. El lado izquierdo de la tabla V indica el color de resultará cuando el componente cromogénico enumerado se escinde de su correspondiente sustrato por la enzima específica para ese sustrato. En el caso de los componentes no cromogénicos, el color es sustancialmente negro y el mecanismo de reacción requiere la presencia de iones de una sal tras la escisión del sustrato, como se explicó anteriormente.

Las enzimas de prueba que se producen por ciertas entidades biológicas (véase la tabla IV) se encuentran en el lado derecho de la tabla V. Los "componentes del sustrato" se muestran a la izquierda de las enzimas de prueba específicas. Cada uno de los componentes del sustrato enumerados en el lado derecho de la tabla V se puede combinar con cualquiera de los componentes cromogénicos o no cromogénicos enumerados en el lado derecho de la tabla V para identificar un sustrato específico para su uso en un medio de prueba. Por lo tanto, se puede entender que la tabla V muestra una gran cantidad de sustratos posibles para su uso de acuerdo con la presente invención. Muchos de los sustratos identificados por el uso descrito anteriormente de la tabla V están disponibles comercialmente, mientras que el procedimiento para producir otros sustratos identificados se describe en la literatura. Aún otros sustratos detectados usando la tabla V sólo son posibles teóricamente.

Los componentes no cromogénicos están incluidos al final del lado izquierdo de la tabla V, y son diferentes de los componentes cromogénicos porque no forman colores específicos tras la escisión. En su lugar, los componentes quinolina o esculetina se combinan con iones de una sal (por ejemplo, sal férrica) que debe estar presente en el medio cuando el sustrato se escinde por la enzima específica. El precipitado sustancialmente negro formado por los componentes no cromogénicos es una combinación del complejo quinolina o esculetina - hierro en lugar de un dímero que se forma por los componentes cromogénicos.

A diferencia de los componentes no cromogénicos, los componentes cromogénicos se deben seleccionar en vista de todos los demás componentes cromogénicos seleccionados para el medio y en vista de los patrones de enzimas de las entidades que se van a detectar. La selección y la concentración de componentes cromogénicos deben maximizar la distinción entre los respectivos colores producidos.

Aunque en la tabla V se enseñan muchas de las distintas posibilidades de componente cromogénico y componente de sustrato/enzima, para un experto en la técnica serán posibles otras posibilidades dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, como se muestra en la tabla V, un experto en la técnica podrá combinar un grupo N-acetilo con muchos de los azúcares de los componentes del sustrato mencionados en la tabla V. Por ejemplo, un grupo N-acetilo se podría combinar con β -D-manopiranosido para formar N-acetil- β -D-manosaminida, siendo la enzima correspondiente N-acetil- β -D-manosaminidasa. Entonces, cualquiera de los componentes cromogénicos o componentes no cromogénicos enumerados en el lado izquierdo de la tabla V se podría combinar con el componente del sustrato para identificar un sustrato. Si el sustrato está comercialmente disponible o se conoce el procedimiento de preparación, el sustrato se podría usar en un medio de prueba. Tras la escisión del sustrato por la enzima correspondiente en medio de la prueba, aparecerá el color enumerado.

Generalmente, las enseñanzas de esta divulgación se pueden usar como sigue para preparar un medio de prueba para detectar distintos microorganismos o tipos celulares. En primer lugar, se seleccionan los microorganismos que se desean detectar y diferenciar. Los organismos preferidos para ser detectados son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y *Salmonella*. Se pueden identificar enzimas producidas por los organismos seleccionados con referencia a la tabla IV.

Teniendo los conocimientos sobre las enzimas específicas producidas por cada microorganismo, se pueden identificar entonces los componentes del sustrato correspondientes del lado derecho de la tabla V. Dependiendo del color deseado, se puede seleccionar un componente cromogénico o no cromogénico a partir de la tabla V que se van a combinar con el componente del sustrato para identificar un sustrato para su inclusión en el medio de prueba. Si el sustrato identificado de este modo está comercialmente disponible o se conoce el procedimiento de su síntesis, se puede usar el sustrato en el medio de prueba.

TABLA V

Matriz de componentes de color y componentes de sustrato		
COMPONENTE CROMOGENICO Y (COLOR)		COMPONENTE DEL SUSTRATO - ENZIMA DE PRUEBA
6-fluoro-3-indolil-	(rosa)	α -D-arabinopiranosido - Aara.
6-cloro-3-indolil-	(rosa/rojo)	α -D-celopiranosido - Acel.
5-bromo-6-cloro-3-indolil-	(magenta)	α -D-fucopiranosido - Afuc.
3-indolil-	(verde azulado)	α -D-galactopiranosido - Agal.
5-bromo-4-cloro-3-indolil-	(verde azulado)	α -D-glucurónido - Agluc.
5-yodo-3-indolil-	(púrpura)	α -D-manopiranosido - Aman.
N-metilindolil-	(verde)	α -D-xilopiranosido - Axyl.
4-metilumbeliferil-	(fluorescente)	β -D-arabinopiranosido - Bara.
rodamina-	(fluorescente)	β -D-celopiranosido - Bcel.
fluoresceína-	(fluorescente)	β -D-fucopiranosido - Bfuc.
resorufina-	(fluorescente)	β -D-galactopiranosido - Bgal.
cumarina	(fluorescente)	β -D-glucopiranosido - Bglu.
nitrofenil-	(amarillo)	β -D-glucurónido - Bgluc.
nitroanilina	(amarillo)	β -D-manopiranosido - Bman.
COMPONENTE NO CROMOGENICO (COLOR)		β -D-xilopiranosido - Bxyl.

(continuación)		
8-hidroxiquinolina más iones-	(sustancialmente / negro)	N-acetil-β-D-galactosaminida -Nagal
3,4-ciclohexenoesculetina más iones	(sustancialmente negro)	N-acetil-β-D-glucosaminida-Naglu
esculetina más iones-	(sustancialmente negro)	N-acetil-β-D-glucuronaminida -Naglu
		N-acetil + otros componentes de azúcar
		butirato - esterasa
		caprilato - esterasa
		palmitato - esterasa

La tabla VI es un resumen conciso de los ejemplos específicos.

TABLA VI - Resúmenes de ejemplos

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
I	8-hidroxiquinolina- β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	color →	Negro	Púrpura-azul	Rosa	Verde azulado
II	8-hidroxiquinolina- β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	6-cloro-3-indolil- β-D-manósido	X	X		X
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	color →	Negro	Púrpura-azul	Rojo-rosa	Púrpura-azul
IIIA	8-hidroxiquinolina- β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	6-cloro-3-indolil- α-D-galactopiranosido	X	X		X

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
IIIA					
	5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	color $\rightarrow$	Negro	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa
IIIB	8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X		X
	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X	X	
	color $\rightarrow$	Negro	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Verde azulado
IIIC	Puede eliminar <i>Aeromonas</i> con inhibidores lo que permite la retirada de 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido de los ejemplos IIIA y IIIB				
IV	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	6-cloro-3-indolil- β -D-manósido	X	X		X
	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X		X
	color $\rightarrow$	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa	Púrpura-azul
V-A	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X		X
	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X	X	

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
	color →	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa
V-B	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X	X	
	color →	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Verde azulado
V-C	Puede eliminar <i>Aeromonas</i> con inhibidores lo que permite la retirada del sustrato N°. 1 del ejemplo V-A y permite la retirada del sustrato N°. 3 del ejemplo V-B				
VI	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	color →	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa	Verde azulado
VII	8-hidroxiquinolina- β-D-glucurónido	X			
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	6-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-galactosaminida		X	X	
	Nota: En el ejemplo 7, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> también se muestran de color rosa junto con <i>Aeromonas</i> color→	Negro	Púrpura-azul	Rosa (véase nota)	Verde azulado
	8-hidroxiquinolina- β-D-glucurónido	X			
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
VIII	6-cloro-3-indolil- β -D-manósido	X	X		X
	6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactosaminida		X	X	
	Nota: En el ejemplo 8, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> también se muestran de color rosa junto con <i>Aeromonas</i> color $\rightarrow$	Negro	Púrpura-azul	Rosa (véase nota)	Púrpura-azul
IX	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X		X
	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactopiranosido		X	X	
	color $\rightarrow$	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa	Verde azulado
X	6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactopiranosido		X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido	X	X		X
	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X	X	X	
	Nota: Para el ejemplo 10, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> también se muestran de color rosa junto con <i>Aeromonas</i> color $\rightarrow$	Púrpura-azul	Púrpura-azul	Rosa (véase nota)	Verde azulado
XI	8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (o) 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	X X	X X	X X	

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
	Nota: En el ejemplo 11, <i>Aeromonas</i> se pueden eliminar añadiendo inhibidores color →	Negro	Rosa o verde azulado	Rosa o verde azulado	No detectado
XII	8-hidroxi-quinolina-β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido (o) 5-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X X	X X		X X
	Nota: En el ejemplo 13, <i>Aeromonas</i> se pueden eliminar añadiendo un inhibidor color →	Negro	Negro	Negro	Rosa o verde azulado
XIII	Usa los mismos sustratos que en el ejemplo Nº. 1, y añade: 4-metil-umbeliferil-β-D-xilopiranosido	Colonias de <i>Enterobacter</i> de color negro que permiten que <i>E. coli</i> . y <i>Klebsiella</i> sean fluorescentes, reducción en el falso que se muestra de este modo como recuento positivo			
XIV	8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil-caprilato				X
	color →	Negro			Rojo-rosa
XV	8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido	X			
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato				X
	6-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	color →	Negro	Rojo-rosa		Azul-violeta
	8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido	X			

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
XVI	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (o) 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido	X X	X X	Inhibidor presente	
	color →	Negro	Verde azulado (o) magenta		
XVII	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		x
	color →	Púrpura oscuro/azul	Azul claro-gris	Rosa	Verde azulado
XVIII	5-yodo-3-indolil-β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	color →	Púrpura oscuro	Azul claro-gris	Rosa	Verde azulado
XIX	indolil-β-D-glucurónido	X			
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X
	color →	Azul oscuro/	Azul claro-Gris	Rosa	Verde azulado
XX	4-metilumbeliferil- β-D-glucurónido	Púrpura	X		
	6-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido	X	X	X	
	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido	X	X		X

(continuación)

Nº. de ejemplo	Sustrato	<i>E. coli</i>	Coliformes generales	<i>Aeromonas</i>	<i>Salmonella</i> *
	color →	Fluorescencia bajo UV	Azul claro-gris	Rosa	Verde azulado
XXI	Usa los mismos sustratos que en el ejemplo Nº. XVII- XIX, y añade: 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido	X	X	X	X
	color →	Azul oscuro/confuso y es fluorescente	Azul claro-gris	Rosa	Verde azulado

* *Shigella* también se puede indicar como este color

N

En los siguientes ejemplos, los ejemplos I, VII, XIII, XVII, XVIII, XIX, XXI son ejemplos de la presente invención, mientras que los ejemplos II, IIIA-VI, VIII-XII, XIV, XV, XVI, XX son ejemplos de referencia.

EJEMPLO I

- 5 Los microorganismos elegidos para ser identificados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y *Salmonella*.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, se puede observar que la enzima de prueba Bgluc tiene un componente del sustrato correspondiente de β-D-glucurónido. Por tanto, un
10 componente cromogénico o no cromogénico que produce un color distinto tras la escisión de Bgluc se debe elegir del lado izquierdo de la tabla V. Se elige 8-hidroxiquinolina por su color sustancialmente negro preferido. Por lo tanto, el primer sustrato identificado es 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido, del que la disponibilidad se describe anteriormente. También se requiere una sal metálica tal como citrato de amonio férrico y se añade al medio de prueba de modo que, tras la escisión del sustrato por Bgluc, se forma un complejo insoluble en agua sustancialmente negro en el medio. El
15 precipitado sustancialmente negro consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

Con referencia adicional a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu generalmente no se producen por *Salmonella*. Por lo tanto, se
20 puede seleccionar un componente del sustrato correspondiente a uno de Bgal, Bfuc y Bglu del lado izquierdo de la tabla V. Se eligen Bgal y el componente del sustrato asociado β-D-galactopiranosido. El componente cromogénico 6-cloro-3-indolil- produce un color rojo-rosa tras la escisión de su sustrato en presencia de Bgal y se selecciona como componente cromogénico. Por lo tanto, el segundo sustrato es 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

Refiriéndose de nuevo a la tabla IV, Bman, Aara y Agal son comunes a *Salmonella* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bman, Aara y Agal no se producen por *Aeromonas*. Por tanto, se puede elegir
25 uno de Bman, Aara y Agal y se puede identificar su componente de sustrato asociado con referencia a la tabla V. Se eligen la enzima de prueba Agal y el respectivo componente de sustrato α-D-galactopiranosido. A continuación, se debe seleccionar un componente cromogénico de la tabla V. Como se muestra en el lado izquierdo de la tabla V, el componente cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolilo produce un color verde azulado tras la escisión de su sustrato asociado y por lo tanto se selecciona. Por lo tanto, el tercer sustrato es 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido.

30 Los coliformes generales tienen un patrón de enzimas amplio que es sensible tanto al sustrato de 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido como al sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido. Por lo tanto, los coliformes general se mostrarán de un cuarto color distinto que es una combinación de los colores producidos por los dos sustratos mencionados anteriormente, respectivamente. En este caso, el cuarto color será violeta-azul, que es una combinación de rojo-rosa y verde azulado.

35 Finalmente, como se observa en la tabla IV, *E. coli* también muestra un patrón de enzimas amplio y es sensible a los tres sustratos elegidos en este ejemplo, viz., 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido. No obstante, las colonias de *E. coli* presentes en el medio de prueba se mostrarán de un color sustancialmente negro porque, como se debatió anteriormente, los sustratos cromogénicos no interfieren con el color sustancialmente negro. Ventajosamente, este color sustancialmente negro proporciona un medio

superior para distinguir el *E. coli*, así como permite que cuatro microorganismos separados sean detectados, cuantificados, diferenciados e identificados en un único medio de prueba. Véase la tabla VI.

EJEMPLO II

5 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados, diferenciados e identificados son *E. coli* como un primer color; coliformes generales y *Salmonella* como un segundo color; y *Aeromonas* como un tercer color.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, se puede observar que la enzima de prueba Bgluc tiene un componente del sustrato correspondiente de β -D-glucurónido. Por tanto, un componente cromogénico o no cromogénico que produce un color distinto tras la escisión de Bgluc se debe elegir del lado izquierdo de la tabla V. Se elige 8-hidroxiquinolina por su color sustancialmente negro preferido. Por lo tanto, el primer sustrato identificado es 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido, del que la disponibilidad se describe anteriormente. También se requiere una sal metálica tal como citrato férrico de amonio y se añade al medio de prueba de modo que, tras la escisión del sustrato por Bgluc, se forma un complejo insoluble en agua sustancialmente negro en el medio. El precipitado sustancialmente negro consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

Con referencia adicional a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no se producen por *Salmonella*. Usando la tabla V en la forma descrita anteriormente, se selecciona 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como el segundo sustrato, que producirá un color rojo-rosa tras la escisión como se indica por la lista de componentes cromogénicos de la tabla V.

20 Como se observa en la tabla IV, la enzima Bman es común a *Salmonella* pero no a *Aeromonas*. De la tabla V, el componente de sustrato asociado con Bman es β -D-manopiranosido. En este ejemplo, también se desea producir el segundo color distinto (rojo-rosa) con *Salmonella* de modo que, en último lugar, las colonias de *Salmonella* presentes en el medio de prueba se mostrarán del mismo color que los coliformes generales presentes en el medio de prueba. Por tanto, el componente cromogénico es 6-cloro-3-indolil- y, por lo tanto, el tercer sustrato es 6-cloro-3-indolil- β -D-manopiranosido.

En este ejemplo, usando de nuevo la tabla V, se identifica un cuarto sustrato que se escindirán por una de las enzimas Bman, Aara, Agal comunes a *Salmonella* para producir un tercer color distinto. Usando la tabla V en la forma descrita anteriormente, el cuarto sustrato seleccionado es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido, que produce un color verde azulado-verde en presencia de Agal común a *Salmonella*.

30 Se pueden predecir los colores resultantes de las colonias presentes en el medio de prueba como sigue. *E. coli* muestra un patrón de enzimas amplio que es positivo para los cuatro sustratos elegidos en este ejemplo, incluyendo el sustrato 8-hidroxi-glucurónido que produce un color sustancialmente negro tras la escisión en presencia de los iones de la sal férrica. Las colonias de *E. coli* se muestran de color sustancialmente negro. *Aeromonas* tiene un patrón de enzimas que reacciona sólo con el sustrato 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido elegido en este ejemplo, y por tanto, las colonias de *Aeromonas* se muestran de un color rojo-rosa. *Salmonella* tiene un patrón de enzimas que escinde ambos sustratos tercero y cuarto seleccionados en este ejemplo, y por tanto, las colonias de *Salmonella* se muestran de color púrpura-azul (una combinación de verde azulado y rojo-rosa). Finalmente, los coliformes generales son positivos para cada uno de los sustratos segundo, tercero y cuarto seleccionados y las colonias de los mismos se muestran de color púrpura-azul, indistinguibles de las colonias de *Salmonella*. Como se debatió anteriormente, no todas las diferentes cepas de todas las especies de los diversos géneros producirán las mismas cantidades de las diversas enzimas, de modo que se pueden dar ligeras variaciones en los matices de púrpura-azul, por ejemplo.

EJEMPLO IIIA

Los microorganismos seleccionados para ser cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* como un primer color; coliformes generales y *Salmonella* como un segundo color; y *Aeromonas* como un tercer color.

45 Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, se puede observar que la enzima de prueba Bgluc tiene un componente del sustrato correspondiente de β -D-glucurónido. Por tanto, un componente cromogénico o no cromogénico que produce un color distinto tras la escisión de Bgluc se debe elegir del lado izquierdo de la tabla V. Se elige 8-hidroxiquinolina por su color sustancialmente negro preferido. Por lo tanto, el primer sustrato identificado es 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido, del que la disponibilidad se describe anteriormente. También se requiere una sal metálica tal como citrato férrico de amonio y se añade al medio de prueba de modo que, tras la escisión del sustrato por Bgluc, se forma un complejo insoluble en agua sustancialmente negro en el medio. El precipitado sustancialmente negro consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

55 Usando las tablas IV y V de forma similar a lo descrito anteriormente con referencia a los ejemplos I y II, se selecciona 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como un segundo sustrato para combinar con una de las enzimas Bgal, Bfuc y

Bglu comunes a coliformes y *Aeromonas*, pero negativas para *Salmonella* para producir un segundo color distinto, en este caso, sustancialmente rojo-rosa.

De forma similar, se selecciona 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido como un tercer sustrato para combinar con Agal, que es común a coliformes y *Salmonella*, pero negativa para *Aeromonas*. Tras la reacción con la enzima, este sustrato también producirá el mismo segundo color distinto, concretamente rojo-rosa.

Se selecciona 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como un cuarto sustrato para combinar con la enzima Bgal, que es común para coliformes y *Aeromonas*, pero negativa para *Salmonella*. Este cuarto sustrato produce un color verde azulado-verde tras la reacción con Bgal.

Se pueden predecir los colores resultantes de las colonias presentes en el medio de prueba como sigue. *E. coli* muestra un patrón de enzimas amplio y es positivo para los cuatro sustratos elegidos en este ejemplo. Por lo tanto, las colonias de *E. coli* se mostrarán de color sustancialmente negro. Las colonias de coliformes generales tienen un patrón de enzimas que es positivo para los sustratos segundo, tercero y cuarto, de modo que las colonias de coliformes generales se muestran de color púrpura-azul. Las colonias de *Aeromonas* tienen un patrón de enzimas que es positivo para los sustratos segundo y cuarto elegidos de modo que las colonias *Aeromonas* también se muestran como de color púrpura-azul. Finalmente, las enzimas comunes a *Salmonella* sólo son positivas para el tercero de los cuatro sustratos, de modo que las colonias de *Salmonella* se muestran de color rojo-rosa.

EJEMPLO IIIB

Como una variación, se puede preparar el medio de prueba del ejemplo IIIA de modo que las colonias de *Salmonella* se mostrarán de color verde azulado en lugar de rosa-rojo, siendo todos los demás colores de las colonias los mismos que en el ejemplo IIIA. Con referencia a la tabla VI, se puede llevar a cabo reemplazando el 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido del ejemplo IIIA con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido.

EJEMPLO IIIC

Se puede lograr un segundo procedimiento independiente para producir los mismos tres colores que en el ejemplo IIIA para los mismos cuatro componentes añadiendo ácido nalidixico u otros antibióticos o inhibidores de *Aeromonas* a los componentes enumerados en el ejemplo 1. Al hacer esto, la cefsulodina o el ácido nalidixico u otras sustancia actúa como un inhibidor para *Aeromonas* de modo que las colonias de *Aeromonas* no crecen. Si se elimina *Aeromonas*, entonces las colonias de color púrpura-azul son todas verdaderos coliformes. Si no se elimina, cualquier *Aeromonas* se contará como parte de los coliformes, lo que algunas personas pueden preferir puesto que *Aeromonas* es un organismo indicador importante.

EJEMPLO IV

En este ejemplo, los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes y *Salmonella* como un primer color distinto y *Aeromonas* como un segundo color distinto. Un medio de prueba que logra este resultado es el medio de prueba descrito en el ejemplo II, excepto porque se omiten el primer sustrato y la sal metálica. Por tanto, debido a que el patrón de enzimas de *E. coli* reacciona con los mismos sustratos que el patrón de enzimas para coliformes generales, *E. coli* y los coliformes generales serán del mismo color en este medio de prueba. Específicamente, las colonias de *E. coli*, coliformes y *Salmonella* se mostrarán de un color púrpura-azul, mientras que las colonias de *Aeromonas* se mostrarán de un color sustancialmente rojo-rosa.

EJEMPLO V

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas* como un primer color distinto y *Salmonella* como un segundo color distinto. Un medio de prueba que logra este resultado es el medio de prueba del ejemplo 3, omitiéndose el primer sustrato y la sal metálica. En este medio de prueba, las colonias de *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas* se mostrarán de un color púrpura-azul, mientras que las colonias de *Salmonella* se mostrarán de un color generalmente verde azulado-verde o de un color rojo-rosa.

Opcionalmente, se puede reemplazar el 6-cloro-3-indolil- α -D-galactósido con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido de modo que las colonias de *Salmonella* se muestren de color verde azulado, en lugar de rosa.

Una tercera forma de lograr el mismo resultado es con un antibiótico, preferiblemente ácido nalidixico, para inhibir el crecimiento de colonias de *Aeromonas*. Si se elimina *Aeromonas*, entonces las colonias de color púrpura-azul son todas verdaderos coliformes. Si no se elimina, cualquier *Aeromonas* se contará como parte de los coliformes, lo que algunas personas pueden preferir puesto que *Aeromonas* es un organismo indicador importante.

EJEMPLO VI

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli* y coliformes como un primer color distinto, *Aeromonas* como un segundo color distinto y *Salmonella* como un tercer color distinto. Un medio de prueba que logra este resultado es el medio de prueba del ejemplo I, omitiéndose el primer sustrato y la sal metálica. En este medio de prueba, las colonias de *E. coli*, y coliformes generales se mostrarán de un color púrpura-azul, las

colonias de *Aeromonas* se mostrarán de un color rojo-rosa, y las colonias de *Salmonella* se mostrarán de un color generalmente verde azulado-verde.

EJEMPLO VII

5 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli* como un primer color distinto que es de color sustancialmente negro; coliformes general como un segundo color distinto que es de color sustancialmente púrpura-azul; *Aeromonas/Vibrio/Plesiomonas* como un tercer color distinto que es de color sustancialmente rojo-rosa; y *Salmonella* como un cuarto color distinto que es de color sustancialmente verde azulado-verde.

10 Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por lo tanto, se debe elegir un sustrato que produzca un color distinto tras la escisión de Bgluc de la tabla V. El 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido produce un color sustancialmente negro en presencia de Bgluc y será la elección preferida de sustrato, como se explica a continuación. También se añade una sal metálica tal como citrato de amonio férrico para formar un complejo insoluble en agua sustancialmente negro que consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

15 Con referencia adicional a la tabla IV, se puede observar que la enzima Ngal y Naglu son comunes a los microorganismos *Aeromonas*, *Plesiomonas*, y *Vibrios*. Por lo tanto, un sustrato adecuado para someter a prueba todos estos microorganismos de un único color distinto es 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactosaminida, que produce un color sustancialmente rojo-rosa en presencia de estas enzimas.

20 Refiriéndose de nuevo a la tabla IV, Bman, Aara y Agal son comunes a *Salmonella* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bman, Aara y Agal no se producen por *Aeromonas*. Por lo tanto, se puede seleccionar un sustrato a partir de la tabla V que reaccione con uno de Bman, Aara y Agal para producir un tercer color distinto. Como se muestra en la tabla V, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido produce un color verde azulado-verde en presencia de Agal y, por tanto, se selecciona como sustrato.

25 En este medio de prueba, las colonias de *E. coli* se mostrarán de color sustancialmente negro, las colonias de coliformes generales se mostrarán de color sustancialmente púrpura-azul, las colonias de *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* se mostrarán de color sustancialmente rojo-rosa, y las colonias de *Salmonella* se mostrarán de color sustancialmente verde azulado.

EJEMPLO VIII

30 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, como un primer color distinto, coliformes y *Salmonella* como un segundo color distinto; y *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* como un tercer color distinto. Un medio de prueba para lograr este resultado es el medio de prueba del ejemplo 2, excepto porque el cuarto sustrato elegido es 6-cloro-3-indolil-N-acetil- α -D-galactosaminida, para el que cada uno de los microorganismos *Plesiomonas*, *Vibrios* y *Aeromonas* son sensibles, de modo que cada una de estas colonias se muestra de un color generalmente rojo-rosa.

EJEMPLO IX

35 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* y coliformes generales como un primer color distinto que es púrpura-azul; *Aeromonas*, *Plesiomonas*, y *Vibrios* como un segundo color distinto que es rojo-rosa; y *Salmonella* como un tercer color distinto que es verde azulado-verde. Se puede lograr este resultado con el medio de prueba como se describe en el ejemplo 6 con la adición de 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactosaminida, para el que cada uno de los microorganismos *Plesiomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* son sensibles.

EJEMPLO X

45 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* y coliformes generales como un primer color; *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* como un segundo color distinto; y *Salmonella* como un tercer color distinto. Un medio de prueba adecuado que logra este resultado es el medio de prueba dado a conocer en el ejemplo 7, excepto porque se omite el primer sustrato para detectar colonias de *E. coli*. En este ejemplo, las colonias de *E. coli* y coliformes generales se muestran de color generalmente púrpura-azul, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* se muestran de color generalmente rojo-rosa, y *Salmonella* se muestran de color generalmente verde azulado-verde. Es necesaria la adición de 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido para proporcionar el color púrpura-azul para las colonias de *E. coli*.

EJEMPLO XI

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* de color sustancialmente negro y coliformes generales de color rojo-rosa.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por lo tanto, se debe elegir un sustrato que produzca un color distinto tras la escisión de Bgluc de la tabla V. El 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido produce un color oscuro en presencia de Bgluc y será la elección preferida de sustrato. También se añade una sal metálica tal como citrato de amonio férrico para formar un complejo insoluble en agua de color negro que consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

Con referencia adicional a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no se producen generalmente por *Salmonella*. Por lo tanto, se puede seleccionar un sustrato a partir de la tabla V que reaccione con uno de Bgal, Bfuc y Bglu para producir un segundo color distinto. El 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido produce un color rosa en presencia de Bgal y se selecciona como el segundo sustrato.

Opcionalmente, se puede reemplazar el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido con 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido de modo que las colonias de *Aeromonas* y coliformes generales se muestren de color verde azulado, en lugar de rosa.

Como se señala, el segundo sustrato seleccionado dará como resultado colonias de *Aeromonas* que también se muestran de un color generalmente rojo-rosa. Para evitar el crecimiento de colonias de *Aeromonas*, se añade un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico. Por tanto, las colonias de *E. coli* se mostrarán de color sustancialmente negro, mientras que las colonias de coliformes generales se mostrarán de color rojo-rosa.

EJEMPLO XII

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas spp.* como un color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* como un segundo color distinto. El primer sustrato seleccionado es 8-hidroxi-quinolina- β -D-galactósido, que da como resultado colonias de *E. coli*, coliformes general y *Aeromonas* que se muestran de color sustancialmente negro. El segundo sustrato elegido puede ser 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido o bien 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido. Si se elige el primero de estos dos sustratos, las colonias de *Salmonella* se mostrarán de un color verde azulado, mientras que si se elige el último de los dos sustratos mencionados anteriormente, las colonias de *Salmonella* se mostrarán de un color rojo-rosa.

Opcionalmente, en este ejemplo, se pueden eliminar *Aeromonas* añadiendo un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico, como se debatió en detalle anteriormente.

EJEMPLO XIII

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son los mismos que en el ejemplo 1, excepto porque este ejemplo ilustra una corrección para falsos positivos. Esto es, es posible que determinados *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* inusuales se mostrarán como colonias de color negro junto con *E. coli* en el medio de prueba dado a conocer en el ejemplo 1. Por tanto, el recuento de *E. coli* podría ser erróneamente alto.

En este ejemplo, se añade 4-metil-umbrelliferil- β -D-xilopiranosido al medio de prueba descrito en el ejemplo 1. Al hacer esto, *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* que se muestran como colonias de color negro también presentan fluorescencia, permitiendo de este modo la reducción en el recuento de falsos positivos de *E. coli*. Este ejemplo ilustra la flexibilidad de las realizaciones que incorpora la presente invención. El componente fluorescente no interfiere con el color sustancialmente negro de modo que las colonias de color negro se distinguen fácilmente a simple vista. Aún, bajo luz ultravioleta, se pueden detectar falsos positivos y se pueden reducir sustancialmente

examinando las colonias de color negro para determinar la fluorescencia.

EJEMPLO XIV

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados, diferenciados e identificados son *E. coli* de color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* de color rojo-rosa. Los coliformes generales son incoloros en este ejemplo.

Con referencia al ejemplo I, *E. coli* es sensible a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Los coliformes generales, *Salmonella* y *Aeromonas* no son sensibles a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Por tanto, el primero sustrato elegido es 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido.

Con referencia a la tabla IV, la enzima esterasa es positiva para *Salmonella spp.*, pero no para cualquiera de los otros microorganismos preferidos para ser detectados. Con referencia a la tabla V, se puede identificar el sustrato 6-cloro-3-indolil-caprilato, y proporcionará un color rosa-rojo tras la escisión y, por lo tanto, se elige como el segundo sustrato.

En este medio de prueba, las colonias de *E. coli* se mostrarán de color sustancialmente negro y las colonias de *Salmonella* se mostrarán de color rosa-rojo.

EJEMPLO XV

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados, diferenciados e identificados son *E. coli* de color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* de color azul oscuro-púrpura y coliformes generales de color rojo-rosa.

- 5 Con referencia al ejemplo I, *E. coli* es sensible a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Los coliformes generales, *Salmonella* y *Aeromonas* no son sensibles a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Por tanto, el primero sustrato elegido es 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido.

Con referencia a las tablas IV y V, se puede identificar 5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato como el segundo sustrato para el que *Salmonella* será sensible. Con referencia adicional a la tabla V, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato forma un color verde azulado tras la escisión.

- 10 Se elige 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido, que produce un color rosa-rojo tras la escisión, como el tercer sustrato para el que *E. coli*, coliformes general y *Salmonella* son sensibles.

En este ejemplo, las colonias de *E. coli* se muestran de color sustancialmente negro, las colonias de coliformes generales se muestran de color rojo-rosa, y *Salmonella* se muestra de color azul-violeta (= rojo-rosa+verde azulado).

EJEMPLO XVI

- 15 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* de color sustancialmente negro y coliformes generales de segundo color distinto.

- Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no se produce por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por lo tanto, se debe elegir un sustrato que produzca un color distinto tras la escisión de Bgluc de la tabla V. El 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido produce un color oscuro en presencia de Bgluc y será la elección preferida de sustrato. También se añade una sal metálica tal como citrato de amonio férrico para formar un complejo insoluble en agua de color negro que consiste en los iones férricos y la aglucona liberados cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

- Con referencia adicional a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no se producen generalmente por *Salmonella*. Por lo tanto, se puede seleccionar un sustrato a partir de la tabla V que reaccione con uno de Bgal, Bfuc y Bglu para producir un segundo color distinto. Se puede elegir 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como el segundo sustrato, en el que las colonias de la prueba de *E. coli* aparecerán de color sustancialmente negro y las colonias de coliformes generales aparecerán de color verde azulado. Opcionalmente, se puede elegir 5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranosido como el segundo sustrato, en el que las colonias de la prueba de *E. coli* aparecerán de color sustancialmente negro y las colonias de coliformes generales aparecerán de color magenta. Para evitar el crecimiento de colonias de *Aeromonas*, se añade un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico. Por tanto, las colonias de *E. coli* se mostrarán de color sustancialmente negro, mientras que las colonias de coliformes generales se mostrarán de color magenta.

EJEMPLO XVII

- 35 Algunos microorganismos seleccionados que se pueden detectar, cuantificar y diferenciar en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y *Salmonella*. Los sustratos de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido, 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido se añaden en cantidades de aproximadamente 125 mg/l de medio; 200 mg/l de medio; y 65 mg/l de medio, respectivamente. La preparación restante y la inoculación del medio de prueba en este ejemplo es similar a lo debatido anteriormente, excepto porque no se requieren iones de sal cuando el medio no tiene sustrato no cromogénico. En este medio, *E. coli*, que reacciona con todos los sustratos, aparecerá de un color azul muy oscuro y/o púrpura debido a que predominará la alta concentración del β -D-glucurónido. Los coliformes generales, que reaccionan tanto a α - como a β -D-galactopiranosido aparecen de un color azul calor-gris. *Salmonella*, que reacciona con el α -D-galactopiranosido tendrá un color verde azulado y *Aeromonas*, que reacciona con β -D-galactopiranosido tendrá un color rosa-rojo. Puede ser beneficioso si la concentración/cantidad usada del β -D-glucurónido es mayor que la del β -D-galactopiranosido para incrementar la diferencia en la coloración/oscuridad entre el *E. coli* y los coliformes generales, puesto que estos sustratos utilizan el mismo compuesto de color en este ejemplo. Sin embargo, incluso si se usan las mismas cantidades de β -D-glucurónido y β -D-galactopiranosido, el *E. coli* todavía puede ser más oscuro y distinguible de los coliformes generales, ya que reacciona con ambos de estos sustratos mientras que los coliformes generales no reaccionan con el β -D-glucurónido.

EJEMPLO XVIII

- Un sustrato de β -D-glucurónido alternado que se puede utilizar es 5-yodo-3-indolil- β -D-glucurónido, que se conoce comúnmente como yodo-Gluc. Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas*, y *Salmonella*. La concentración del β -D-glucurónido debe ser suficiente para proporcionar un color púrpura muy oscuro que se puede distinguir fácilmente del color azul-gris de los coliformes generales.

EJEMPLO XIX

Otro sustrato de β -D-glucurónido alternado que se puede utilizar es indoxil- β -D-glucurónido, que se conoce comúnmente como IBDG. Con una concentración suficiente de IBDG, *E. coli* aparecerá más oscuro de las otras colonias de un color azul oscuro-púrpura. Los coliformes generales, *Salmonella*, y *Aeromonas* aparecerán de color azul claro-gris, verde azulado y rojo-rosa, respectivamente.

EJEMPLO XX

En este ejemplo, se usa 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido, conocido comúnmente como MUGluc, en lugar de un β -D-glucurónido cromogénico o no cromogénico. Con este medio, *E. coli* presentará fluorescencia bajo luz ultravioleta, y los coliformes generales serán de color azul claro-gris, *Salmonella* será de color verde azulado, y *Aeromonas* será de color rosa-rojo a la luz ambiental. Una ventaja del MUGluc es que los tiempos de incubación requeridos para la detección de las colonias pueden ser sustancialmente menores que los requeridos con otros sustratos cromogénicos o no cromogénicos. Un tiempo de incubación de aproximadamente 14 horas debe ser suficiente para detectar *E. coli* con este sustrato. Una desventaja es que los productos fluorescentes son más rápidamente difusibles que los otros compuestos y pueden hacer más difíciles la cuantificación del *E. coli*. Sin embargo, incluso si el *E. coli* no se puede cuantificar en una prueba dada, sin duda seguirá siendo adecuado para la prueba de presencia/ausencia para *E. coli*.

EJEMPLO XXI

En este medio, se combina un 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUGluc) con uno de los otros sustratos de glucurónido cromogénicos o no cromogénicos mencionados previamente, así como con α - y β -D-galactopiranosidos cromogénicos. Este medio ofrece la ventaja de que se puede realizar una prueba de presencia/ausencia para *E. coli* con tiempos de incubación menores que los requeridos para los sustratos cromogénicos y no cromogénicos. Además, si por cualquier razón, no se sabe si las colonias de organismos detectados son de *E. coli* o de coliformes general, se puede examinar el medio bajo luz ultravioleta de modo que se puedan confirmar las colonias de *E. coli* por fluorescencia. Esto proporciona una doble comprobación sobre la exactitud de la identidad de las colonias.

Aunque se han descrito anteriormente varios ejemplos amplios que incorporan la presente invención, se debe saber que la presente invención no está limitada por los ejemplos dados a conocer en el presente documento. De hecho, la divulgación y los ejemplos anteriores enseñan a un experto en la técnica un número virtualmente ilimitado de medios de prueba que podrían estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

Además, mientras que se ha descrito que esta invención tiene un diseño preferido, la presente invención se puede modificar además dentro del alcance de esta divulgación y reivindicaciones. Por lo tanto, esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención usando sus principios generales. Además, esta solicitud está destinada a cubrir tales desviaciones de la presente divulgación como vienen dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que se refiere esta invención y que está dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. U medio de prueba adecuado para detectar, cuantificar o diferenciar coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Salmonella spp.*, comprendiendo dicho medio de prueba:
 - un sustrato de β -D-glucurónido, que forma un primer producto en presencia de *E. coli*;
 - 5 un sustrato cromogénico de α -D-galactósido, que forma un segundo producto en presencia de la *Salmonella*;
 - y un sustrato cromogénico de β -D-galactósido, que forma un tercer producto en presencia de *Aeromonas*, teniendo cada uno de tales productos un color que es visualmente distinguible entre sí, dichos productos de dichos sustratos de α -D-galactósido y β -D-galactósido forman una combinación de colores en presencia de coliformes generales, de modo que los coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas*, y *Salmonella* son visualmente distinguibles entre sí, y
 - 10 **caracterizado** además, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido y uno de cualquiera de dicho sustrato cromogénico de α -D-galactósido o dicho sustrato cromogénico de β -D-galactósido consiste en el mismo componente de color, pero en diferentes cantidades.
2. El medio de prueba de la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido y dicho sustrato de α -D-galactósido es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido.
- 15 3. El medio de prueba de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho medio tiene una concentración de aproximadamente 125 mg/l de β -D-glucurónido y 65 mg/l de α -D-galactósido.
4. El medio de prueba de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido es 5-yodo-3-indolil- β -D-glucurónido.
5. El medio de prueba de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido es indoxil- β -D-glucurónido.
- 20 6. El medio de prueba de la reivindicación 1, que incluye un segundo sustrato de β -D-glucurónido que consiste en 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido.